

水産総合研究センター 研究報告

別冊 5

平成18年3月

BULLETIN OF FISHERIES RESEARCH AGENCY

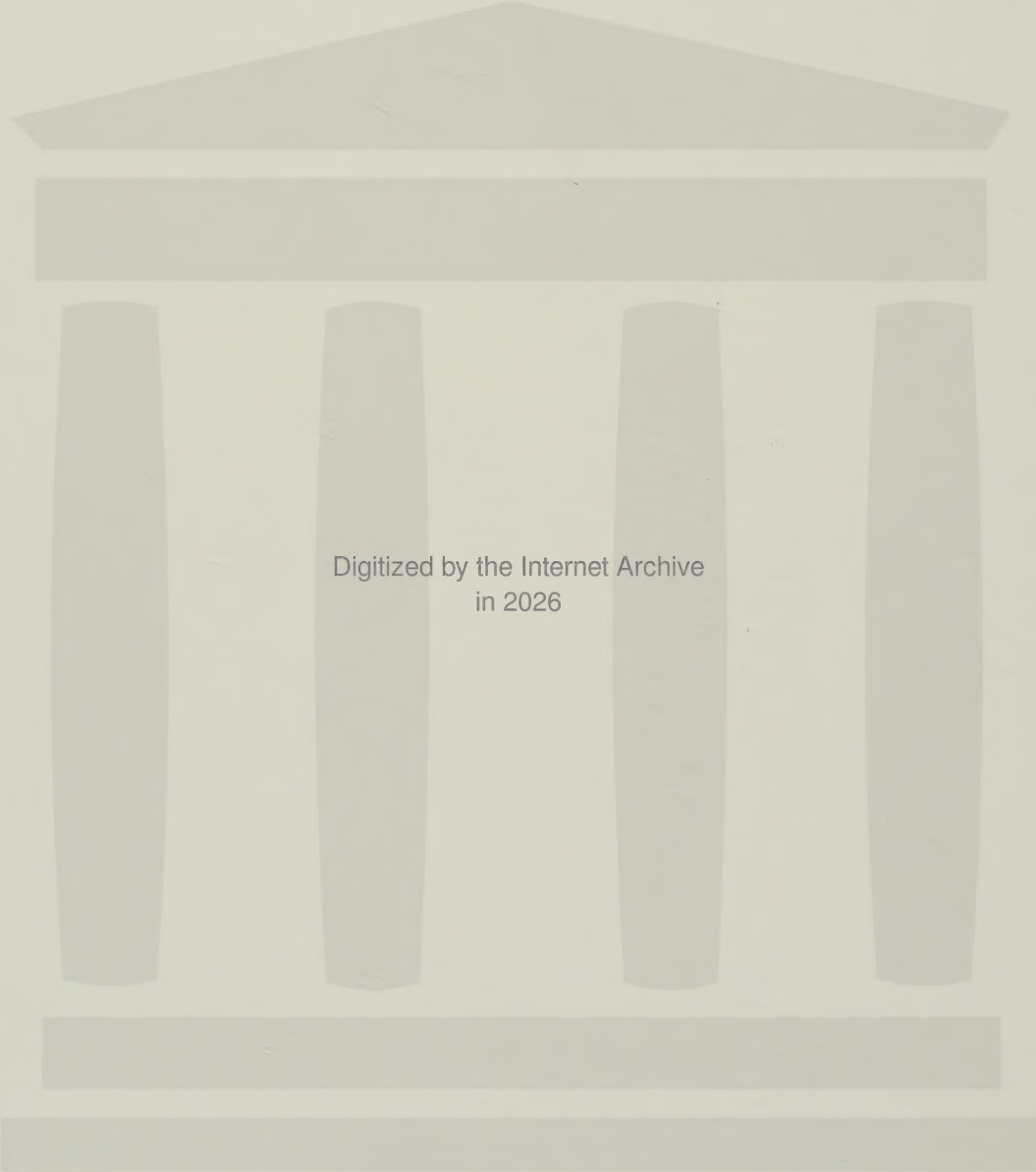
Supplement No.5
March 2006

特別号

独立行政法人水産総合研究センター交付金プロジェクト
生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発
— 第1期成果 —

Library
Pacific Islands Fisheries Science Center
Nat'l Marine Fisheries Service
2570 Dole St. Honolulu, HI 96822-2396
Received 1 July 2006

独立行政法人 水産総合研究センター
神奈川県横浜市
FISHERIES RESEARCH AGENCY
Yokohama, Kanagawa, Japan



Digitized by the Internet Archive
in 2026

序

人工種苗生産と天然の生産力の利用を前提とした種苗の放流を中心に展開される「栽培漁業」は40余年の歴史を重ね、広く一般に根付いた言葉となっている。現在ではマダイ、ヒラメを初めとして80種以上の魚介類が生産、放流されている。

我が国の水産生物資源の多くは近年低水準にあり、このため、その原因究明とともに人工種苗の放流による資源回復への期待も大きい。積極的な資源増大は平成13年に定められた水産基本法においても重要施策として位置づけられている。しかし、多種多様な魚介類を対象とする栽培漁業では、その基盤となる種苗生産と放流のための技術がまだ開発の途上にあると言える。種苗生産技術においては、従来の一般的な生産方式が適用できない種について、試行錯誤的に個別に研究が進められており、対象種の生体機能の解明を基礎にした体系的生産技術の開発が求められている。また、生物多様性条約の発効を契機に、種苗放流技術においては、生態系への影響にも配慮した「責任ある栽培漁業」の展開に必要な科学的知見の蓄積が求められている。

このような背景のもとに、水産総合研究センターでは、平成13年に交付金プロジェクト研究「生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発」を立ち上げ、(1) 生育・成熟等の生化学・分子生物学的解明に基づく種苗生産技術の高度化、(2) 添加資源等の生態学的・分子生物学的解明に基づく放流技術の高度化、の課題をかかげて研究を開始した。種苗生産については、親エビを天然に依存しているクルマエビについて、養成親エビによる種苗生産に必要な技術の開発、養殖種苗を天然シラスウナギに依存しているウナギでは、受精卵からシラスウナギに至る生産技術の開発を目指した。また、放流技術では磯根資源のアワビ類、沿岸資源のヒラメ及び淡水資源のアユをモデル対象種とし、初期生活史の解明を基礎に、分子生物学的手法を応用した野生集団の遺伝的構造の把握、放流魚の遺伝的特性の解明、放流魚の量的変動の定量化手法の開発を進め、生態系の保全及び遺伝的多様性に配慮しつつ、効果的な資源添加を実現するために必要な技術的な基礎の確立を目指した。

本書は、平成13年から15年に実施したプロジェクト研究第1期の成果を取りまとめたもので、それぞれの報告では専門外の読者にも分かり易い内容を意識したつもりである。第1期の3年間では、人工ふ化の成功から30年に亘って研究者たちの挑戦をはねつけてきた厚い壁であるシラスウナギの人工生産を、生体機能に合わせた新たな飼料の開発、飼育装置の改良を通じて世界で初めて実現させたほか、多くの成果を上げることができた。その一方で、生態系保全型増養殖システムの確立へ向けた技術開発の道には、まだ多くの難問が山積している。本書がこれらの問題解決に取り組む上で参考になる素材として役立てば幸いである。

平成18年3月

中央水産研究所長 山田 久

水産総合研究センター研究報告

別冊第5号

平成18年3月

目次

序

1. 生育・成熟等の生化学・分子生物学的解明に基づく種苗生産技術の高度化

難種苗生産種の完全養殖実現に挑む

田中秀樹（種苗生産チームリーダー） 1

1) クルマエビサブチーム

クルマエビの親エビ生産ー成熟機構と催熟条件の解明を目指してー

山野恵祐（クルマエビサブチームリーダー） 3

① クルマエビの成熟に対する各種ホルモンの作用の解明

ークルマエビのホルモンは脊椎動物と同じか？ー

奥村卓二 5

② クルマエビ催熟への餌飼料からのアプローチ

ークルマエビの成熟に関与する餌料生物の化学成分の検討ー

斎藤洋昭・青野英明・丹羽健太郎 9

③ 人工催熟によるクルマエビの再生産形質についてー安定採卵のための催熟条件の検討ー

伏屋玲子・佐野元彦・清水弘文・玉城泉也・林原毅・加藤雅也 15

④ クルマエビにおける卵形成機構の解明ー卵黄タンパク質合成の調整メカニズムー

会田勝美 21

⑤ クルマエビの卵の発達過程を探るー成熟卵を特徴づける物質の生合成過程の解明ー

山野恵祐・鵜沼辰哉 25

2) ウナギサブチーム

シラスウナギの人工生産に向けて

鵜沼辰哉（ウナギサブチームリーダー） 31

① ウナギ親魚および卵の効率的な確保を目指して

ー若齡魚からの採卵と卵脂肪酸に及ぼす親魚飼料の影響ー

山田智・堀勝彦・瀬岡学 33

② ウナギの卵成熟・排卵および卵質に及ぼす要因の解明

香川浩彦 39

③ ウナギ卵黄タンパクの生化学ー分子動態と浮遊性調節への関与ー

松原孝博・安藤忠・大久保信幸・澤口小有美 45

④ 個別飼育法によるニホンウナギの卵質判定

鵜沼辰哉・野村和晴 51

⑤ ウナギ仔稚魚の消化生理機能の発達過程を探る 黒川忠英・鈴木徹	57
⑥ ウナギ仔魚用飼料・飼育システムの開発 ―世界で初めてシラスウナギの人工生産に成功― 田中秀樹・野村和晴・山本剛史・奥宏海	63

2. 資源添加等の生態学・分子生物学的解明・評価に基づく放流技術の高度化

生態系保全・遺伝的多様性確保を可能とする効果的種苗放流技術開発の試み

福田雅明（放流技術チームリーダー）	71
-------------------------	----

1) アワビサブチーム

アワビ類の資源増殖を目指して

堀井豊充（アワビサブチームリーダー）	73
① アワビ類初期生態解明のための種判別技術の開発 浜口昌巳・佐々木美穂・堀井豊充・清本節夫・大橋智志・藤井明彦・滝口直之・ 橋本加奈子・竹内泰介	75
② 相模湾沿岸で見られたアワビ類浮遊幼生と付着初期稚貝の種組成の相違 堀井豊充・黒木洋明・梶ヶ谷義一・滝口直之・浜口昌巳	85
③ 無節石灰藻を用いたアワビ類浮遊幼生用コレクターの有用性について（英文） 清本節夫・渡邊庄一・末永丈右・山中洋紀・藤井明彦・興石裕一・堀井豊充	91
④ 天然エゾアワビ幼生はどの程度の浮遊期間を経て着底するのか？（英文） 高見秀輝・深澤博達・河村知彦	97
⑤ エゾアワビ当歳稚貝量に及ぼす親貝密度の影響 干川裕・高橋和寛・津田藤典・町口裕二	119
⑥ マイクロサテライトDNAマーカーからみたアワビ人工種苗の遺伝的変異性 原素之・関野正志	127

2) ヒラメサブチーム

ヒラメ種苗の放流効果の増大を目指して

首藤宏幸（ヒラメサブチームリーダー）	137
① ヒラメの遺伝的集団構造と地域的生理生態特性に関する研究 中山耕至・大河俊之・丸山祐理子・田結庄義博・田中克	139
② 開放性海域におけるヒラメ放流魚の移動および産卵群への加入過程の定量的評価 藤井徹生	143
③ ヒラメ人工種苗のDNAマーカー標識 ―放流魚追跡のための効果的手法―（英文） 関野正志	147
④ 佐渡島真野湾に放流したヒラメ種苗の被食減耗 首藤宏幸・梶原直人・藤井徹生	165
⑤ 三陸大野湾におけるヒラメ稚魚の最適放流量の推定 山下洋・栗田豊・山田徹生・山田秀秋・高橋一生	169

3) アユサブチーム

アユの種苗放流が生物の多様性に与える影響

内田和男（アユサブチームリーダー） 175

① 海域におけるアユ仔稚魚の生態特性の解明

大竹二雄 179

② アユ個体群の構造解析における進展とその今日的意義

井口恵一郎・武島弘彦 187

③ 鼠ヶ関川におけるアユ個体数の推定

内田和男・清水昭男・阿部信一郎・佐藤年彦・桂和彦・坂野博之 197

④ アユと河川生態系における他生物との関係

片野修・阿部信一郎・中村智幸 203

難種苗生産種の完全養殖実現に挑む

種苗生産チームリーダー
田中秀樹*

Challenges to achieve closed cycle breeding of intractable species in seed production

Hideki TANAKA*

海産魚の種苗生産技術は1980年代以降大きな進歩を遂げ、現在ではマダイ、ヒラメを初めとして年間100万尾以上の種苗が生産されている魚種が11種、10万尾を超えるものは30種に及ぶ。甲殻類ではクルマエビを初めとして100万尾以上の量産が可能になっている種が8種、それ以下のものも含めると16種の種苗が生産されている。さらに貝類では32種で種苗生産が可能になり、頭足類のコブシメ、マダコ、棘皮動物のウニやナマコの種苗生産技術開発も進められている。これらの技術開発には天然個体の生活史の研究、繁殖生態や各成長段階での生息環境、餌料に関する研究が非常に重要な役割を果たしてきた。また、飼育環境下での稚仔の初期餌料の開発、栄養要求の解明、良質な卵稚仔を得るための親養成技術、成熟産卵機構の解明とその制御技術の開発が積み重ねられて、今日の種苗生産技術が形成されてきたといえるであろう。マダイやヒラメ、クルマエビ等、極めて大量の種苗が生産されている先進的な種で開発された技術が新たな種苗生産対象種に応用されてきた例も多い（日野ら、2003）。

しかしながら、種苗生産がこれほど盛んに行われているクルマエビでさえ、その成熟機構は未解明な部分が多く、親エビはほぼ全面的に天然に依存しているのが現状である。内水面養殖業で最も重要な魚種の一つであるウナギは、天然の成熟個体や受精卵が発見されていないなどその生活史はまだ謎に包まれており、毎年数億尾に上る養殖用種苗の需要はすべて天然の稚魚の捕獲に頼っている。多大な努力によって1970年代に人工ふ化には成功したものの、近年まで飼育下での初期餌料の手がかりさえつかめず、人工種苗生産の実現は水産研究における最も困難な課題の一つとされてきた。このように、数多くの魚介類で種苗生産技術開発や増養殖が推進されているにもかかわらず、必ずしも全生活環を飼育下でコントロールし、安定して多量の種苗を生産できるようになっているわけではない。また、すでに種苗の量産が行われるようになった種も含めて多くの魚介類で、生産された卵や精子、胚および稚仔などの質的変動が放流用種苗や養殖用種苗としての価値を左右することから、高品質の配偶子や稚仔を生産する技術の開発が強く求められている。今後、計画的で合理的な種苗生産技術を開発するためには、対象とする魚介類の生育・成熟等を生理・生化学、分子生物学的に解明し、高度な種苗生産技術を開発することが必要である。

平成13年度から15年度まで実施された水産総合研究センター交付金プロジェクト「生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発（栽培プロ研）」の第1期では、種苗生産に用いる親エビを基本的に天然に依存しているクルマエビにおいて、成熟開始から産卵に至るホルモンの動態や成熟関連遺伝子の発現を解析して、それらの情報を基に成熟促進技術を開発し、養成親エビによる種苗生産技術を確立することを目指した。また、長年の研究によって受精卵の確保がようやく可能になったウナギにおいて、現在の催熟技法の隘路となっている卵質変動についてその要因を解析し、合理的な卵質評価手法を開発するとともに、これを指標として成熟・産卵促進手法を改良し、高品質の成熟卵を効率的に得る技術の開発に取り組んだ。さらに、人工ふ化の成功から30年に亘って研究者たちの挑戦をはねつけてきた厚い壁である受精卵からシラスウナギに至る成長過程を先端的手法を用いて解析し、生体機能に合わせた新たな飼料の開発、飼育装置の改良を通じてシラスウナギの人工生産を世界で初めて実現させることを目指した。

* 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

これらの研究成果の詳細は後段の各論文に譲るが、難種苗生産種を難種苗生産種たらしめている生活環の中の厚い壁に挑み完全養殖の実現を目指すことは、種苗生産技術全体のレベルアップにつながり、その中で開発された個々の技術は将来多くの種に応用されることが期待される。

参考文献

- 日野明徳, 熊井英水, 若林久嗣, 2003: 6. 増養殖・魚病の研究, 「日本水産学会70年史 日本水産学会誌・第69巻特別号」(日本水産学会編), 日本水産学会, 東京, pp.59-71.
-

クルマエビの親エビ生産 —成熟機構と催熟条件の解明を目指して—

クルマエビサブチームリーダー
山野恵祐*

Production of mature female shrimp in captivity: mechanisms of maturation and conditions to induce maturation

Keisuke YAMANO*

クルマエビ種苗生産は、藤永元作らの先駆的な研究の成果に基づき種苗生産が開始され、既に30年以上にわたり大規模な種苗生産、放流の事業が実施されている。その一方で、未だ親エビを飼育環境下で催熟、産卵させる技術が確立されていないために、大部分の種苗生産機関では、漁獲物からよく成熟した雌エビを選別し、生産施設に輸送、収容して、その当日もしくは数日内に放卵された受精卵を用いて種苗を生産している。親エビを漁獲物に依存していることやこのようにして入手した親エビの産卵率が必ずしも高くはないといったことは、計画的、効率的なクルマエビ種苗生産を行う上での大きな障害になっている。加えて、1990年代に起こったクルマエビ急性ウイルス血症の大流行以降、種苗生産に用いる親エビのウイルス保有検査が実施されており、それにかかる労力も甚大なものとなっている。また近年では、遺伝子多様性の保全の観点から、放流用種苗の親エビには放流海域のエビを用い、かつ、十分な多様度を保つように配慮して利用することが求められている。このようなことからクルマエビの人為催熟技術の開発に関する要望はますます強いものとなっている。

人為催熟技術を開発、向上するにあたっては、第一には成熟に必要な飼育環境、飼餌料条件などの成熟を促す要因を明らかにすること、第二には成熟の仕組みを明らかにし、それを利用する技術を考案することが重要である。

これまでの種々のクルマエビ類での試験研究結果や実際の飼育を通じての経験から、クルマエビの成熟には、水温と餌が重要な要因となりうることが示唆されている。餌については、生餌の多毛類を給餌することが成熟促進に有効とされているが、有効成分等は全く分かっていない。また、甲殻類では眼柄を切除すると卵巣発達が促進されることが知られており、産卵誘発技術として利用している施設もある。しかし、特に天然から捕獲した親エビでは、眼柄切除で産卵まで確実に誘導することは難しいことや、眼柄を切除した個体はしばしば死亡に至るといったことなどから、これが汎用される技術にまではなっていない。

成熟機構に関しては、本プロジェクト開始の直前にクルマエビからクルマエビ類最初の卵黄タンパク前駆物質（ピテロジェニン）遺伝子がクローニングされ、卵黄タンパク質の生産機構を詳細に調べる端緒が開かれた。一方眼柄内にあると想定される成熟抑制因子を含めてクルマエビ類の成熟をコントロールする体内の因子に関してはほとんど不明のままであった。

以上のような状況を踏まえて、本プロジェクトではクルマエビの成熟機構と催熟条件を明らかにすることを目的として、「クルマエビの成熟に対する各種ホルモンの作用の解明」、「クルマエビの成熟に関与する餌料成分の解明」、「クルマエビ親エビ養成システムの構築」、「クルマエビにおける卵形成機構の解明」、「クルマエビ卵の最終成熟関連遺伝子の探索と動態解明」の5つの課題を立てて研究に取り組んだ。それぞれの成果については、以降の各課題の報告に解説されているのでご一読願いたい。

* 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

クルマエビの成熟に対する各種ホルモンの作用の解明 —クルマエビのホルモンは脊椎動物と同じか?—

奥村卓二*

Hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones during ovarian development in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*

Takuji OKUMURA*

Abstract For further development of shrimp seed-production, the importance of broodstock management is increasing. However, few hormones have been determined, and hormonal manipulation of shrimp reproduction is limited to eyestalk ablation for the induction of ovarian development and oviposition. In this study, involvement of vertebrate-type steroid hormones on ovarian development was examined in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. Fluctuation of hemolymph levels of estradiol- 17β , estriol, testosterone, 11-ketotestosterone, and progesterone were not correlated to ovarian development. This suggests that the examined vertebrate-type steroid hormones do not play an important role in ovarian development of *M. japonicus*.

Key words: kuruma prawn, steroid, maturation, eyestalk ablation, blood level

姿形が良く味覚も良いクルマエビは水産上重要視され、以前から天然資源の増殖が進められている。放流用種苗生産には、漁獲された成熟雌エビが用いられるが、天然エビに依存しているため、成熟エビの入手や採卵成績が安定しない問題がある。この問題を解決するために、飼育下で成熟させたり、天然エビの産卵を促進したりする技術開発が求められているが、実現できていない。その主な原因として、クルマエビの成熟関連ホルモンが同定されていないことがあげられる。

成熟に関与するホルモンは、脊椎動物でよく研究されている。卵形成の過程で卵母細胞は減数分裂を中断して卵黄を蓄積する。魚やカエルなどの卵生脊椎動物では、脳の下垂体から分泌される生殖腺刺激ホルモンが卵巣濾胞細胞でのエストラジオール- 17β の合成と分泌を促進し、血中に分泌されたエストラジオール- 17β が肝臓に働いて卵黄タンパク前駆物質（ビテロジェニン）の合成を促進して卵黄形成を進める。

卵黄形成が完了した卵母細胞は減数分裂を再開して極体を放出するが、この過程を卵成熟という。卵成熟は、生殖腺刺激ホルモンが卵巣濾胞細胞の 17α , 20β -ジヒドロキシ-4-プロゲネン-3-オン（アマゴ）またはプロジェステロン（カエル）の分泌を促進し、これらのホルモンが卵母細胞に働くことで引き起こされる。

こうした脊椎動物のホルモンは、甲殻類にも存在することが知られており、同様な内分泌調節があることが示唆されているが、まだ明らかになっていない。そこで本研究では、脊椎動物のホルモンについて雌クルマエビの血中量を測定して卵形成との関連を調べ、その役割を検討した。

自然成熟過程での血中ステロイドホルモン量

百島栽培センターの素振り池で自然成熟した雌クルマ

くまから採血し、血中のホルモン量を市販の酵素免疫測定キットを利用して測定した (Okumura and Sakiyama, 2004)。卵形成段階を組織観察により、前卵黄形成期 (RNAの蓄積が進んでいるが、脂肪やタンパク質の蓄積はまだ進んでいない段階)、内因性卵黄形成期 (脂肪やタンパク質が卵母細胞で合成され蓄積される段階)、外因性卵黄形成期 (ビテロジェニンが取り込まれて卵黄タンパク質が卵母細胞に蓄積され、急激に卵母細胞が大きくなる段階) の3段階にわけた (Fig. 1)。卵形成にともなって生殖腺指数 (GSI) は急激に大きくなった (Fig. 2 a)。

脊椎動物のステロイドホルモンであるエストラジオール-17 β 、エストリオール、テストステロン、11-ケートテストステロンおよびプロジェステロンの血中量は、

1~30pg/mLと低く、卵黄形成との間に明瞭な関連は見られなかった (Fig. 2 b)。

眼柄切除で誘導された成熟過程での血中ステロイドホルモン量

眼柄を切除していない未熟な雌クルマエビと両眼柄を切除して卵黄形成を誘導した雌クルマエビとから採血し、血中のホルモン量を測定した (Okumura and Sakiyama, 2004)。未切除エビの卵巣は前卵黄形成期で、GSIは0.80であった (Fig. 3 a)。眼柄切除エビでは、卵黄形成が進んで卵巣は外因性卵黄形成期になり、GSIは2.43であった。

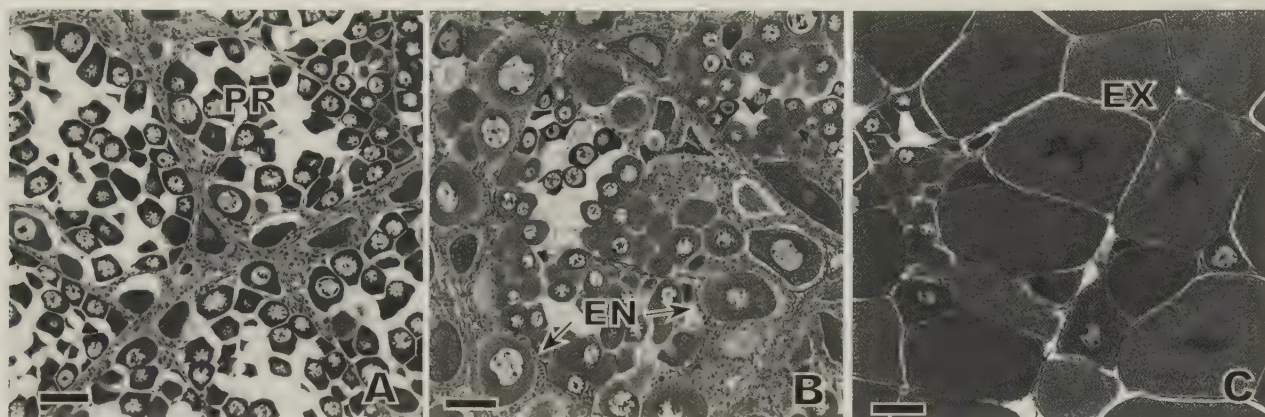


Fig. 1. Ovarian development in *Marsupenaeus japonicus*. A, previtellogenic ovarian stage; B, endogenous vitellogenic ovarian stage; C, exogenous vitellogenic ovarian stage. PR, previtellogenic oocyte; EN, endogenous vitellogenic oocyte; EX, exogenous vitellogenic oocyte. Bar=0.1mm. Hematoxylin-eosin staining.

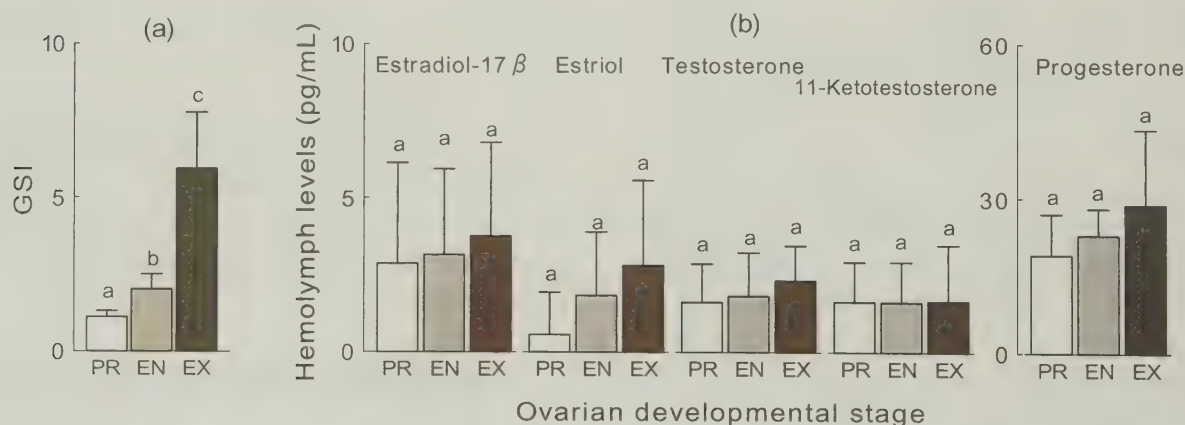


Fig. 2. Gonadosomatic index (GSI, a) and hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones (b) at the ovarian developmental stage in female *Marsupenaeus japonicus* under the natural reproductive cycle. PR, previtellogenic ovarian stage; EN, endogenous vitellogenic ovarian stage; EX, exogenous vitellogenic ovarian stage. Data are given as mean and SD. Bars with no common letters indicate significant differences ($P < 0.05$).



Fig. 3. Gonadosomatic index (GSI, a) and hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones (b) in control unablated and eyestalk-ablated female *Marsupenaeus japonicus*. PR, previtellogenic ovarian stage; EN, endogenous vitellogenic ovarian stage; EX, exogenous vitellogenic ovarian stage. Data are given as mean and SD. Bars with no common letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

脊椎動物のステロイドホルモンであるエストラジオール-17β, エストリオール, およびプロジェステロンの血中量は, 4~25pg/mLと低く, 卵形成段階がことなる未切除エビと切除エビとの間に有意な差異が見られなかった (Fig. 3b)。

一般にホルモンの血中量変化は, そのホルモンの作用を示す指標である。本研究では, 自然成熟過程と眼柄切除による成熟誘導過程で血中ホルモン量と卵形成との関連を調べたが, 明瞭な関連は見られなかった。このことは, 脊椎動物のステロイドホルモンがクルマエビでは卵形成に生理作用を持たないことを示唆する。これまでにこれらのステロイドホルモンをエビに投与しても明瞭な効果がないことが報告されてきたが, もともと甲殻類に生理作用をもたないことが原因と考えられる。こうしたステロイドホルモンを利用した催熟の試みは, クルマエビに有効でないと考えられる。

おわりに

これまで脊椎動物のステロイドホルモンが甲殻類でも作用をもつと考えられて, ステロイドホルモンを利用した催熟が試みられてきたが, 本研究により, 脊椎動物のステロイドホルモンがクルマエビの卵形成の進行と関連した動態を示さないことが示された。以上から, 甲殻類の卵形成を調節する内分泌機構は, 脊椎動物と異なると考えられた。

脊椎動物とは異なる甲殻類独自のホルモンとして, これまでに, 卵黄形成抑制ホルモン, メチルフェルネソエートや造雄腺ホルモンなどが卵形成に関与することが報告されてきた (Okumura, 2004)。しかし, それらのホルモンの作用は十分に明らかになっていない。

最近では培養法とビテロジェニン遺伝子発現測定を組み合わせた生理活性検定法が利用できるようになっている。今後は, こうした活性検定法を利用して, 既知のホルモンの作用を明らかにするとともに, 未知のホルモンを探索することが必要だろう。そして, 甲殻類の成熟に関与するホルモンが明らかになれば, ホルモンを利用した催熟技術開発が可能になると期待される。

文 献

- Okumura, T., 2004: Perspectives on hormonal manipulation of shrimp reproduction. *JARQ*, **38**, 49-54.
- Okumura, T. and Sakiyama, K., 2004: Hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones in female kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae) during natural reproductive cycle and induced ovarian development by eyestalk ablation. *Fisheries Sci.*, **70**, 372-380.

クルマエビ催熟への餌飼料からのアプローチ —クルマエビの成熟に関与する餌料生物の化学成分の検討—

齋藤洋昭^{*1}・青野英明^{*2}・丹羽健太郎^{*2}

Do the chemical components in wild prey have an influence to maturation of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*?

Hiroaki SAITO^{*1}, Hideaki AONO^{*2} and Kentaro NIWA^{*2}

Abstract In order to estimate the influence to maturation of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* by the chemical components in wild prey, we analyzed an effect of organic compounds in the prey worm, such as a polychaeta *Perinereis nuntia*. The tissue lipids in *Perinereis nuntia* might have an activity for maturation of kuruma prawn. The lipid and fatty acid compositions of the crude lipid in *Perinereis nuntia* were determined, and it had very low levels of DHA compared with other marine animal lipids. The maturation of kuruma prawn might not be influenced by these n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) containing DHA, because the low levels of n-3 PUFA in *Perinereis nuntia* were also observed.

Key words: kuruma prawn, maturation, feed, calm worm, lipid

クルマエビの種苗生産量は増加しているが、採卵用親エビの確保は昔ながらの天然採捕に限られ、経験的な選別収集に依存している。天然資源が減少する中で、親エビ需要が増大し、採卵にはホルモンを用いる、眼柄を切除するなどの人為的産卵の方策が試みられているが、実験段階を越えず、的確な手法が確立されていない。成熟や産卵に関しての生理、生態的知見が乏しいこともあり、クルマエビの親エビ養成技術は滞っている。

水産総合研究センター百島栽培漁業センター（百島実験池）において、粗放的に育成された稚エビでは20%前後の個体に卵巣発達がみられ、親エビ養成の可能性が示唆されている（福永，1982）。本実験池の特性は広大な廃止塩田を利用し、厚さ20cmに及ぶ砂敷きであり、注排水は自然下濤を利用している。このことから、できるだけ自然に近い形での餌条件、環境条件による

親エビ養成が成熟・産卵に適していると推定されているが、成熟や産卵誘発の主要因については全く明らかになっていない。また、金沢（1983）や矢野（1988）はクルマエビ最終成熟がホルモンや眼柄処理により誘発されることを記載している。さらに、金沢（1993）、Alave *et al.*（1993）は成熟・産卵にリン脂質や高度不飽和脂肪酸が関与することを示唆している。飼料に添加したビタミンやリン脂質が体内における脂質の移行・運搬を促進し、生殖巣の発達に効果があると推定されているが、詳細は明らかになっていない。

本研究では百島実験池の種々の環境条件の中で餌条件に着目し、人工飼料との相違を明らかにする。また、人工飼料に天然餌料由来の脂質成分を添加した天然脂質添加飼料を調製し、成熟・産卵に与える影響を検討し、成熟に関わる飼料性化学成分を明らかにする。特に、砂泥域でクルマエビの天然飼料となっていると考

2005年11月15日受理（Received: November 15, 2005）

^{*1} 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市金沢区福浦2-12-4（National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan）

^{*2} 中央水産研究所横須賀庁舎 〒238-0316 神奈川県横須賀市長井6-31-1（Yokosuka branch, National Research Institute of Fisheries Science, 6-31-1, Nagai, Yokosuka, Kanagawa 238-0316, Japan）

えられるイソゴカイなどの多毛類の影響について検討し、クルマエビの成熟や産卵への関与を明らかにし、親エビ養成技術への端緒とする。

砂泥域の動物餌料の効果

砂泥域の動物餌料モデルとしてイソゴカイ（アオイソメ *Perinereis nuntia*）を投与し、配合飼料と比較することから成熟への効果を調べた。成熟開始に近いクルマエビ（平均体長17.9cm, 平均体重41.6g）に、イソゴカイ生き餌を投与（イソメ区）し、対照区として配合飼料（ヒガシマル社ゴールドブローン）を給餌（配合区）し、29～30日間、複数回飼育した。成熟度の評価は、透過光を用いた目視による卵巢発達の評価、卵巢重量、組織切片の顕微鏡観察（卵形成過程の推定）、卵巢のピテロジェニン遺伝子発現量の定量により行った。その結果、すべての区で成長はほぼ同じで、同程度の体長・体重増加が観察された。また、成熟度に関しては、いずれの評価法でも、配合区では成熟の促進はまったく見られず、ときに退行も見られたが、イソメ区で一部の個体に成熟の進行が見出された。このように、配合飼料とイソゴカイ生き餌では、成熟に対し顕著な相違が観察され、砂泥域の動物に催熟効果が示唆された。

砂泥域動物由来の脂質成分の効果

クルマエビ成熟に関して、イソゴカイに、配合飼料と異なる有効性が見出されたため、イソゴカイの生体内化学成分の中で脂溶性成分に着目した。イソゴカイ脂質を抽出し、長期催熟試験を行い、その効果について検討した。



Fig. 1. The kuruma prawn after the maturation influenced by the lipids of *Perinereis nuntia*.

イソゴカイを凍結乾燥し、Folchの方法に類似させ脂溶性成分を抽出し、得られた粗製脂質を配合飼料（ヒガシマル社製）に約5%重量濃度で添加したイソゴカイ抽出脂質添加配合飼料（イソメ油添加区）を調製し、4～6ヵ月間飼育した。対照区として約5%大豆油を添加し栄養的にはほぼ同じ大豆油配合飼料（大豆油添加区）を調製し、同じ条件下で飼育した。試験は2期行い、低水温の12月～4月までの時期（第Ⅰ期）と高水温の3月～9月までの時期（第Ⅱ期）に、給餌試験を行った。

大豆油添加区、イソメ油添加区、それぞれについて比較したところ、若干の相違はあったものの、いずれの区も同様に成長し（有意差なし）、栄養条件はほぼ同じであることが示唆された。

低水温期（18.0～22.0℃）では両区とも成熟しなかったが、高水温期（21.1～27.2℃）では、それぞれの区で異なった結果が得られた。大豆油添加区では、まったく成熟が見られなかったのに対し、イソメ油添加区では、6ヵ月経過後、5個体中3個体が透過光による成熟度比較、卵巢重量及び組織切片の顕微鏡観察の、すべての評価法によって、成熟の進行が観察された（Fig. 1, Fig. 2, Table 1, Table 2）。

成熟に影響を与える要因に、主要因として水温が推定されたが、水温の他にイソゴカイ抽出脂質に関しても、成熟誘発の可能性が示された。これらのことから、砂泥域の餌料生物の脂質成分が成熟に影響を与えることが示唆された。

イソゴカイの脂質成分

クルマエビ成熟に関して、イソゴカイ抽出脂質に、

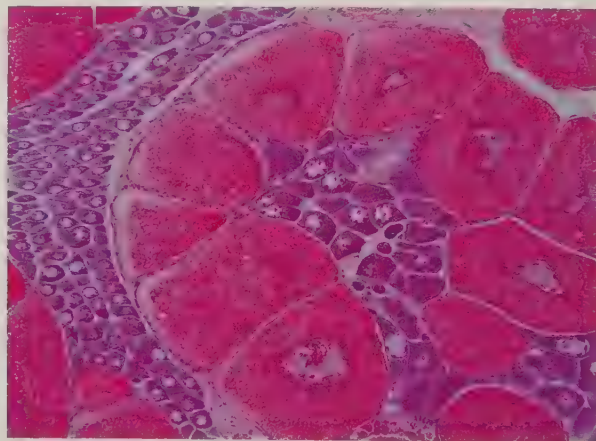


Fig. 2. The matured ovary of kuruma prawn influenced by the lipids of *Perinereis nuntia*.

Table 1. Changes of body size and maturation of Kuruma prawn under low sea-water temperature (18.0-22.0°C)

	Sex	Replicate animals (n)	Body length (cm)	Body weight (g)	Maturity ^a	Ovary weight (g)	GSI
Starting (0 day)							
Soybean	♀	30	15.4±0.4	29.2±1.7	0.0±0.0	0.1±0.1	0.5±0.2
<i>P. nuntia</i>	♀	30	16.0±0.4	31.7±2.4	0.0±0.0	0.3±0.3	1.0±0.7
After 2 months							
Soybean	♀	5	15.0±0.6	30.6±2.8	0.1±0.3	0.1±0.1	0.5±0.2
<i>P. nuntia</i>	♀	5	16.2±0.3	34.7±1.5	0.1±0.3	0.2±0.0	0.6±0.1
After 3 months							
Soybean	♀	5	15.6±0.4	33.4±1.1	0.3±0.4	0.2±0.1	0.7±0.2
<i>P. nuntia</i>	♀	5	16.2±1.1	34.7±5.9	0.1±0.3	0.2±0.1	0.7±0.3
After 4 months							
<i>P. nuntia</i>	♀	9	16.2±0.8	36.6±4.8	0.4±0.4	0.3±0.1	0.9±0.1

^a Maturity score by estimation of looking:
non-maturation; 0, A-; 0.7, A; 1.0, A+; 1.3, B-; 1.7, B; 2.0, B+; 2.3, C-; 2.7, C; 3.0, C+; 3.3, perfect matured D: 4.

Table 2. Changes of body size and maturation of Kuruma prawn under medium sea-water temperature (21.1-27.2°C)

	Sex	Replicate animals (n)	Body length (cm)	Body weight (g)	Maturity ^a	Ovary weight (g)	GSI
Starting (0 day)							
Soybean	♀	30	17.5±0.5	41.1±4.1	1.0±0.7		
<i>P. nuntia</i>	♀	30	18.0±0.6	43.7±4.1	1.2±0.7		
After 4 months							
Soybean	♀	5	18.0±0.4	50.2±3.1	0.4±0.5	0.5±0.2	1.0±0.3
<i>P. nuntia</i>	♀	5	18.1±0.2	53.8±3.6	0.3±0.4	0.5±0.1	1.0±0.2
After 5 months							
Soybean	♀	5	18.1±0.8	54.3±4.0	0.0±0.0	0.7±0.2	1.2±0.3
<i>P. nuntia</i>	♀	5	18.1±0.8	52.9±4.1	0.1±0.3	0.5±0.1	1.0±0.3
After 6 months							
Soybean	♀	10	18.7±0.5	57.5±3.1	0.0±0.0	0.5±0.1	0.8±0.2
<i>P. nuntia</i>	♀	5	19.4±1.0	63.9±10.0	0.9±0.9	1.2±0.8	1.7±1.0

^a Maturity score by estimation of looking:
non-maturation; 0, A-; 0.7, A; 1.0, A+; 1.3, B-; 1.7, B; 2.0, B+; 2.3, C-; 2.7, C; 3.0, C+; 3.3, perfect matured D: 4.

配合飼料と異なる有効性が見出されたため、脂質の化学分析を行い、配合飼料中の脂質との相違について調べた（齋藤，2003）。

イソゴカイの脂質含量は1.0%程度と低く、脂質クラスにおいて、中性脂質ではトリアシルグリセロールが主成分で、相当量のステロール類、少量のワックスエステル、などを含み、極性脂質ではホスファチジルエタノールアミンやホスファチジルコリンなどのリン脂質が主成分であり、一般的な海産動物脂であった。全脂質の脂肪酸組成では、ドコサヘキサエン酸（DHA，22:6n-3）は少なく、配合飼料に比較して1/10程度であった（Table 3）。一方、イコサペンタエン酸（EPA，

20:5n-3）は、両者ともに、中程度の量含まれていた。イソゴカイでは n-3 PUFA の比率は配合飼料ほど高くなかった。一方、イソゴカイ脂質にはアラキドン酸（20:4n-6）や n-6 ドコサテトラエン酸（22:4n-6）が相当量見出され、餌脂質の生体内濃縮が推定された。また、非メチレン中断型ジエン酸が相当量含まれていた。以上の結果、今まで効果がしばしば取りざたされた DHA は成熟に影響せず、他の脂質成分がその起因となることが示唆された。また、イソゴカイ、配合飼料とも n-6 PUFA が比較的高かったが、これはいずれも含まれる陸上植物由来の脂質によると推定された。

Table 3. Fatty acid compositions of the feed stuff and the *Perinereis nuntia* lipids (%)

	Feed stuff of Arasaki	Feed stuff of Ishigaki	<i>P. nuntia</i> of Arasaki	<i>P. nuntia</i> of Ishigaki
Total saturated	29.0 ± 0.2	26.8 ± 1.6	29.8 ± 0.5	29.4 ± 0.5
14:0	4.2 ± 0.1	4.3 ± 0.5	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.1
15:0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.7 ± 0.0	1.1 ± 0.1
16:0	18.9 ± 0.1	17.1 ± 1.1	19.1 ± 0.9	14.8 ± 0.1
17:0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	1.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1
17:0 i	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.0
18:0	3.8 ± 0.1	3.2 ± 0.0	5.1 ± 0.0	6.7 ± 0.2
22:0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.0
Total monoenoic	24.3 ± 0.0	23.6 ± 0.1	22.1 ± 0.8	22.0 ± 0.7
16:1n-7	5.2 ± 0.1	4.5 ± 0.5	4.5 ± 0.4	3.3 ± 0.2
17:1n-8	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.0
18:1n-9	8.9 ± 0.0	8.4 ± 0.1	3.5 ± 0.0	3.3 ± 0.1
18:1n-7	3.8 ± 0.0	4.0 ± 0.1	1.9 ± 0.1	2.1 ± 0.2
18:1n-5	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0	6.5 ± 0.2	7.1 ± 0.3
19:1n-8(9)	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0
20:1n-13	1.3 ± 0.0	1.2 ± 0.1	1.7 ± 0.0	2.2 ± 0.1
20:1n-9	1.6 ± 0.0	1.5 ± 0.1	2.3 ± 0.1	1.5 ± 0.1
20:1n-7	0.5 ± 0.0	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.0	0.7 ± 0.0
22:1n-11	1.0 ± 0.0	1.1 ± 0.3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Total dienoic	0.3 ± 0.0	0.1 ± 0.1	5.7 ± 0.0	6.6 ± 0.2
20:2n-9, 15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	1.5 ± 0.0	1.1 ± 0.0
20:2n-7, 15	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.0
22:2n-7, 15	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	3.7 ± 0.0	4.6 ± 0.1
Total n-4 polyenoic	1.2 ± 0.0	1.0 ± 0.3	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0
16:2n-4	0.9 ± 0.0	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.0	1.0 ± 0.0
16:3n-4	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
Total n-6 polyenoic	15.6 ± 0.1	14.8 ± 0.2	14.4 ± 0.9	14.4 ± 0.6
18:2n-6	13.2 ± 0.0	12.4 ± 0.2	1.7 ± 0.3	2.2 ± 0.1
18:3n-6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	1.1 ± 0.0	1.1 ± 0.1
20:2n-6	0.3 ± 0.0	0.3 ± 0.0	3.3 ± 0.6	2.5 ± 0.1
20:3n-6	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.4 ± 0.0
20:4n-6	1.6 ± 0.0	1.6 ± 0.1	2.7 ± 0.1	3.2 ± 0.2
22:4n-6	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	5.0 ± 0.1	4.7 ± 0.1
22:5n-6	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.0
Total n-3 polyenoic	27.3 ± 0.1	30.5 ± 1.6	21.6 ± 0.4	16.9 ± 2.5
18:3n-3	1.6 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.2 ± 0.3	1.1 ± 0.1
18:4n-3	1.3 ± 0.0	2.1 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.0 ± 0.0
20:4n-3	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.0	0.2 ± 0.0	0.2 ± 0.1
20:5n-3	12.3 ± 0.1	14.4 ± 0.5	14.4 ± 0.5	10.1 ± 2.4
22:5n-3	0.6 ± 0.0	0.6 ± 0.1	3.5 ± 0.2	3.7 ± 0.1
22:6n-3	10.9 ± 0.0	11.2 ± 1.0	1.7 ± 0.1	1.4 ± 0.1

おわりに

クルマエビの成熟には主に、水温の影響が大きいことが明らかとなったが、イソゴカイの抽出脂質が、成熟誘発効果を示したことから、少なくとも多毛類などの動物性の餌生物の有する化学成分が一因となる可能

性が見出された。さらに、DHAなどの n-3 PUFA の影響はさほど大きくないことが示唆された。

文 献

Alave, V. R., Kanazawa, A., Teshima, S., and

- Koshio, S., 1993: Effect of dietary phospholipids and n-3 highly unsaturated fatty acids on ovarian development of kuruma prawn. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 345-351.
- 福永辰広, 1982: 百島実験地におけるクルマエビの親養成事例. *さいばい*, **22**, 32-38.
- 金沢昭夫, 1983: 甲殻類. 水産学シリーズ41「魚介類の成熟・産卵の制御」. 恒星社厚生閣, pp. 80-89.
- 金沢昭夫, 1993: 水産動物における高度不飽和脂肪酸およびリン脂質の生理効果. 水産学シリーズ96「水産脂質—その特性と生理活性」. 恒星社厚生閣, pp. 69-79.
- 齋藤洋昭, 2003: イソゴカイ (*Perinereis nuntia*) の脂質成分. 第42回日本油化学会年会講演要旨集, 225.
- 矢野 勲, 1988: クルマエビ属. 水産学シリーズ71「エビ・カニ類の種苗生産」. 恒星社厚生閣, pp. 54-63.

人工催熟によるクルマエビの再生産形質について

— 安定採卵のための催熟条件の検討 —

伏屋玲子^{*1}・佐野元彦^{*2}・清水弘文^{*3}・玉城泉也^{*1}・林原 毅^{*1}・加藤雅也^{*1}

Artificially induced maturation by eyestalk ablation in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*.

Reiko FUSEYA^{*1}, Motohiko SANO^{*2}, Hirofumi SHIMIZU^{*3},
Motoya TAMAKI^{*1}, Takeshi HAYASHIBARA^{*1} and Masaya KATOH^{*1}

Abstract Eyestalk ablation is an effective technique for artificial induction of maturation in penaeid shrimps. To induce maturation in cultured female kuruma prawn, methods of eyestalk ablation and optimal conditions of prawns and of rearing environments were examined. Eyestalk ablation was effective for prawns with developing ovary that were older than 12 months and larger than 140mm in total length. The most successful spawning was seen when prawns had been operated to remove single eyestalks just after molting and were reared at 24°C.

Key words: kuruma prawn, spawning, eyestalk ablation, temperature, molting, maturation

クルマエビは西太平洋、インド洋沿岸に広く分布し、内湾、内海の砂泥域に生息する（三宅，1982）。本種は甲殻類の中でも漁業対象種として重要であるため、種苗生産・放流による栽培漁業が行われている。また、有用種の中でもクルマエビは漁業・流通価値が高いため、養殖も盛んに行われている。

一般にエビ類は交尾に先立ち、雌が脱皮を行う。クルマエビも雌が脱皮直後の甲殻が柔らかい時に交尾を行うが、その際に雄が雌に交尾栓をつけることが繁殖戦略の特徴として知られている。繁殖期間中に雌は脱皮後、交尾、産卵を繰り返し、一回の脱皮周期の間に数日間隔で複数回の産卵を行う。また、産卵において本種は抱卵を行わないことも特徴としてあげられる

（武田，1995）。

養殖産業が長期にわたり拡大し、種苗放流も全国で行われているため、近年、クルマエビの安定採卵に向けて親エビ養成に関する研究の需要が高まっている。種苗生産を行っている機関・施設では二通りの採卵方法が試みられている。一つは養殖池である程度成熟した親エビを陸上水槽に移して産卵を待つ方法である。また、養成したエビではなく繁殖期に漁獲した天然エビのうち成熟した個体を選別し、同様に自然産卵を待つという方法もある。この場合、天然エビを用いると漁獲変動に左右されるため、親エビの確保が問題になる。もう一つの採卵方法は眼柄処理により人工的に催熟させ、採卵を行う方法である（Bray and

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

^{*1} 西海区水産研究所石垣支所 〒907-0451 沖縄県石垣市字浮海大田148-446 (Ishigaki Tropical Station, Seikai National Fisheries Research Institute, 148-446, Fukai Ohta, Ishigaki, Okinawa 907-0451, Japan)

^{*2} 水産総合研究センター研究調査部 〒220-6115 神奈川県横浜市区みなとみらいクイーンズタワーB15階 (Fisheries Research Agency, Queen's Tower B 15F, Minatomirai, Nishi, Yokohama, Kanagawa 220-6115, Japan)

^{*3} 中央水産研究所 〒236-8648 神奈川県横浜市区金沢区福浦2-12-4 (National Research Institute of Fisheries Science, 2-12-4, Fukuura, Kanazawa, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan)

Lawrence, 1992)。自然産卵および人工催熟のどちらの方法を用いても技術的に未解明な部分が多いために問題点が残る、安定した採卵には至っていないのが現状である。現在の天然エビに依存した種苗生産では、親エビが急性ウイルス血症（PAV）などのキャリアになっていることが考えられるため、養成した親エビを用いた人工催熟による供給が期待されており、可能になれば天然資源による影響を受けにくくなると思われる。養成したクルマエビを用いた人工催熟における再生産形質の不良要因や産卵の非同期性要因が解明されることにより、安定した大量採卵の可能性がある。本研究では成熟誘起手法開発の一環として、養成したクルマエビに眼柄処理を用いた人工催熟を施し、成熟、産卵について飼育実験により検討を行った。

養成エビ（眼柄処理）と天然エビの比較

飼育下で養成したエビと天然から漁獲したエビを用い、眼柄処理による人工催熟と自然産卵について比較検討した。

卵巣内卵数

飼育した養成クルマエビに片眼柄切除による眼柄処理を施し、屋内の2t水槽（水温22℃，流水）でアオゴカイを与えて飼育し、産卵直前と思われる時に解剖により卵巣を取り出した。また、有明海および橘湾で漁獲された天然エビから卵巣を採取した。それぞれの卵巣内卵数を計測し、比較したところ、天然エビの卵巣内卵数は養成エビよりもばらつきが大きく、また眼柄処理を行った養成エビは体長が大きくなるにしたがい、天然エビよりも卵数が少ないことがわかった。

産卵数

片眼柄切除を行った養成エビと何も施していない天然エビを100ℓ水槽（水温25または28℃，流水）で個別飼育を行い、産卵数および受精卵の卵径について調べた。同サイズのエビで産卵数を比較すると天然エビに

比べ眼柄処理を行った養成エビでは約半分程度の数であった。受精卵の平均卵径は養成エビでは297（最小294－最大301）μmであるのに対し、天然エビでは282（278－288）μmと15μmの差がみられた。

以上の結果から、天然エビの自然産卵と比較すると、眼柄処理による人工催熟では、急激に卵巣が発達するため卵巣内卵数が少なく、部分的に産卵してしまうために一回の産卵数が少なくなることが推察された。

眼柄処理による養成エビの人工催熟

クルマエビの効率的な採卵のために、人工催熟を行う方法や飼育および用いるエビの条件について検討した。

眼柄処理法

眼柄処理の方法はそれぞれの機関などで異なっているため、その処理方法について検討した。片眼柄切除、両眼柄切除、片眼柄あるいは両眼柄にペンチでつまんで傷をつけるピンチングを行う4つの眼柄処理法を用いて、水温25℃で飼育し、次の脱皮までのへい死率および産卵率について比較した。眼柄切除および両眼柄ピンチングでは産卵がみられ、また切除とピンチングのどちらの方法でも両眼柄に対して処理を行うとへい死率が高いことがわかった（Table 1）。産卵率は片眼柄切除が100%と最も高く、片眼柄ピンチングではまったくみられなかった。産卵率とへい死率の両方を考慮すると、採卵には片眼柄切除による人工催熟が最も効果的であると考えられた。

人工催熟に適した親エビのサイズと齢期

前年の4月に種苗生産により養成したエビのうち、7，8ヵ月齢の体長110－140mm，12ヵ月齢の130－140mm，18，19ヵ月齢の160mm前後の個体を用いて脱皮3日後に片眼柄切除を行い、100ℓ水槽（水温25℃，流水）でアオゴカイを与えて飼育した。実験期間中に産卵がみられなかった場合は、次の脱皮後3日目に解剖

Table 1. Effects of eyestalk operation patterns on artificial induction of maturation

Group	No. of prawns used	Spawning rate (%)	Mortality (%)
Unilateral eyestalk ablation	6	100	29
Bilateral eyestalk ablation	6	33	83
Unilateral pinch of eyestalk	4	0	25
Bilateral pinch of eyestalk	4	25	75

Table 2. Effect of unilateral eyestalk ablation on the spawning of prawns of various body length (BL) and age

Group	Unilateral eyestalk ablation	No. of prawns used	Spawning rate (%)
BL 110mm	Yes	6	0
7 months old	No	3	0
BL 130mm	Yes	6	0
7 months old	No	3	0
BL 140mm	Yes	7	0
8 months old	No	2	0
BL 130mm	Yes	6	0
12 months old	No	3	0
BL 140mm	Yes	7	100
12 months old			
BL 160mm	Yes	7	86
18-19 months old			

し卵黄タンパクの蓄積を調べた。対照として眼柄処理をしない個体についても同様に観察した。7, 8 ヶ月齢では眼柄処理の有無にも関わらず産卵がみられなかった (Table 2)。

しかし、7, 8 ヶ月齢の個体の中でも140mm前後で眼柄処理を行った場合では、卵黄タンパクの蓄積はみられたが、産卵にまでは至らなかった。また、12 ヶ月齢のエビでは140mm前後でも眼柄処理により産卵を行うことが明らかになった。産卵にはある程度に加齢または季節などの環境要因が関わっている可能性があると考えられた。

眼柄処理と卵巣成熟の変化

眼柄処理後の外観からの卵巣の様子と実際の卵巣の状態について検討するために、養成エビを片眼柄切除後、100 ℓ 水槽 (水温25℃, 流水) でアオゴカイを与えて個別飼育を行った。外観により卵巣のステージを1,

1－2, 2, 2－3, 3, 3+の6段階に分け、腹部の卵巣からバイオプシにより卵巣組織を経日的に採集し、顕微鏡下で卵黄球後期, 表層胞前期, 表層胞後期などのステージを記録した。その結果、外観ステージが進行するにつれて、卵黄蓄積も進み、退行することなく表層胞が出現した夜には産卵が確認された (Table 3)。

また、外観から卵巣が成熟していると思われる個体と未成熟の個体に分けて眼柄処理を行い、次の脱皮まで個別飼育を行った。試験したすべての個体で産卵がみられたが、外観からの卵巣が未成熟な場合はへい死率が高かった (Table 4)。

以上のことから、外観からの様子と卵巣の発達はほぼ同じ状態であると考えられた。外観からの卵巣の成熟状態に関わらず、眼柄処理後に産卵が行われることが明らかになった。しかし、未成熟の場合はへい死率が高かったため、採卵には卵巣が成熟したエビを用いることが効果的であると考えられた。

Table 3. Ovarian development examined by external observation and biopsy after unilateral eyestalk ablation

Body length	Ovary width at day 0	Observation day after unilateral eyestalk ablation							
		1	2	3	4	5	6	7	8
158mm	6 mm	2-3	3:C	2:S	2-3	3:C	2:S		
150mm	6 mm	2-3	3:A	3:B	2:S				
160mm	2 mm	2	1-2	1-2:M	2	2	2-3:A	3:C	2:S
157mm	7 mm	2-3:M	3	3:A	3:B	2-3:S			

1, 1-2, 2, 2-3, 3: indices of ovarian development examined by external observation; Larger number indicates the larger ovary.

A, late yolk globule stage; B, early cortical alveoli stage; C, late cortical alveoli stage; M, molting; S, spawning at previous night.

Table 4. Effect of unilateral eyestalk ablation of immature and mature prawns on spawning and survival.

Ovary	No. of prawns used	Spawning rate (%)	Average days from operation to spawning	Mortality (%)
Mature	7	100	4.5	29
Immature	7	100	5	71

適正飼育水温

人工催熟に適した水温を把握するために、20、22、24、26℃の水温を設定し、それぞれの水温で飼育していた養成エビを脱皮後3日目に片眼柄切除を施し、100ℓ水槽（眼柄処理前と同じ水温、流水）で、アオゴカイを与えて個別飼育を行った。一個体あたりの総産卵数は水温が20、22℃区に比べて、24、26℃区の方が多かったが、ばらつきも多かった（Fig. 1）。平均産卵数が多かった高水温実験区は産卵率および産卵回数も多く、特に24℃区においては産卵率が100%と全個体で産卵が確認された（Table 5）。また、平均産卵回数および産卵一回あたりの平均産卵数も水温が高い方が多く、24℃区の産卵回数は最も多い2.9回であった。初回産卵までの日数をみると、水温が高くなるにつれて早く産卵することが明らかになった。しかし、水温が高

くなると脱皮間隔が短くなり、へい死率も高い傾向がみられた。

生理的適水温であるかどうかを検討するために、4つの実験水温を含む水温14–34℃の11段階でLDH酵素活性について調べた結果、実験に用いた水温はどれも酵素活性に差はみられず、この水温範囲内の試験は妥当であると考えられた。また、眼柄処理後の水温を22、25、28℃に設定し、ほぼ同様の実験を行ったところ、25℃が適しているという結果がえられた（Sano *et al.*, 2003）。

以上の結果から、人工催熟を考える上で水温は重要な要因であり、産卵率、産卵数、産卵回数および生残を考慮すると、水温24℃で眼柄処理を行うことが最も効果的であると考えられた。

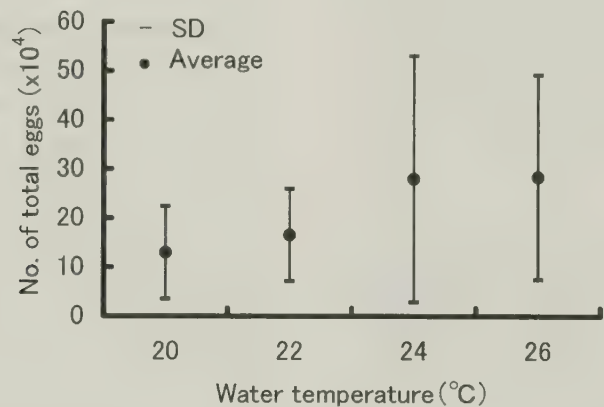


Fig. 1. Total number of eggs spawned by unilaterally eyestalk-ablated prawns reared at 20, 22, 24 and 26° C. The number of eggs were accumulated until the first molting after the eyestalk ablation.

Table 5. Effects of the water temperature on the spawning of unilaterally eyestalk-ablated prawns

Water temperature	No. of prawns used	Spawning rate (%)	Average number of spawning	Average period until first spawning (days)
20℃	11	63.6	1.9	15.3
22℃	11	63.6	2.0	10.4
24℃	10	100	2.9	7.0
26℃	10	90	2.3	5.8

脱皮周期と眼柄処理の時期

脱皮周期を考慮して眼柄処理を施す最適な時期を検討した。脱皮したばかりの甲殻が柔らかい脱皮後期、甲殻が硬くなり安定している脱皮間期、次の甲殻が形成されて脱皮の準備が整う脱皮前期の3段階に分け、催熟に用いる養成エビのサイズと実験水温24℃から、脱皮周期は20日前後と予測されたため、それぞれ脱皮後2、10、17日目に片眼柄切除を行った。水温を24℃に設定した2t水槽2基で個体識別したエビを飼育し、脱皮が確認されると100ℓ水槽（水温24℃、流水）でそれぞれの眼柄処理予定日まで個別飼育し、眼柄処理後はアオゴカイを給餌した。眼柄処理後から次の脱皮までの産卵率は2日目処理区が90%と最も多く、10日目処理区では75%、17日目処理区は最も少ない40%であった。平均総産卵数は2日目処理区が64.6万粒、10日目処理区が58.5万粒、17日目処理区で52.5万粒であった。一脱皮周期における平均産卵回数も2日目処理区が3.9回と最も多く、次に17日目処理区となり、10日目処理区が最も少なかった（Table 6）。産卵、脱皮もなくへい死した個体は2日目処理区ではみられなかったが、10日目処理区では最も多い33.3%、17日目処理区では10%のへい死率であった（Table 6）。眼柄処理後のへ

い死は2日目処理区では23日目までみられず、最も生残がよかった（Fig. 2）。10日目処理区では6日目には25%がへい死していたが、50日目になるとどの処理区もへい死率が70%以上になっていた。また、眼柄処理の時期が脱皮から日数が経過するにつれて、その脱皮間隔が長くなるため、脱皮にも影響を与えることがわかった（Table 6）。
以上の結果から産卵数、産卵回数および生残を考慮すると、脱皮後期（本実験では脱皮後2日目）に眼柄処理を行うことによって、最も効率的な採卵が可能と思われた。

おわりに

養成したクルマエビに眼柄処理を施し、飼育実験により人工催熟の条件について検討を行った。眼柄処理による採卵には片眼柄を切除する方法が適していると判断された。外観による卵巣の発達状況は卵巣組織の状態を反映していると考えられるため、眼柄処理から産卵まで飼育を行う際に指標として重要であることがわかった。採卵効率を考えた飼育条件として、水温は24℃に設定することが有効であると考えられた。また、

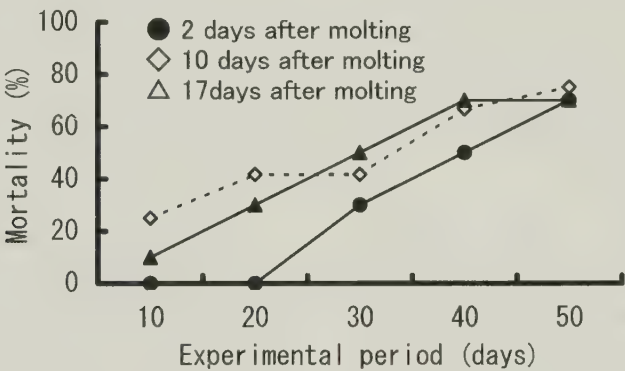


Fig. 2. Accumulative mortality of 3 groups after eyestalk ablation. The eyestalk was unilaterally ablated 2, 10 and 17 days after molting.

Table 6. Effects of unilateral eyestalk ablation of prawns at various molting stages on spawning and molting

Group	No. of prawns used	Dead prawn without spawning and molting (%)	Average number of spawning	Average period from operation to molting (days)
Day 2 after molting	10	0	3.9	22.3
Day 10 after molting	12	33.3	2.8	25.7
Day 17 after molting	10	10	3.1	29.6

催熟に用いる親エビは生まれて12ヵ月以上経過し、体長140mm以上、脱皮後間もない脱皮後期で、外観からある程度卵巣が成熟した個体を選択することが、産卵および生残の点から最も効果的であることが明らかになった。

天然エビの自然産卵と養成エビの人工催熟により採卵の比較を行ったところ、産卵された受精卵の卵径に違いがみられた。また、人工催熟による方法では天然エビに比べて産卵数が少ないことが明らかになり、その原因として急激に卵巣の発達が早まるために部分的産卵をすることが考えられた。養成エビの人工催熟に関する条件は絞られたが、天然エビの自然産卵と比較すると卵巣の成熟機構の違いが推察されることもあり、人工催熟では天然エビの自然産卵による産卵数には及ばないことが留意される。今後の課題として養成エビの卵巣の成熟、飼育環境条件、自然産卵とその同期化についても検討する必要があると思われる。クルマエビの成熟、産卵機構を解明することにより、より安定した採卵に向けて親エビ養成技術の向上が期待できる。

文 献

- Bray W. A. and Lawrence A. L., 1992: Reproduction of *Penaeus* species in captivity, in "Marine Shrimp Culture: Principles and Practices" (ed. by Fast A. W. and Lester L. J.), Development and Aquaculture and Fisheries Science, 23, Elsevier, Amsterdam, pp. 93-170.
- 三宅貞祥, 1982: 原色日本大型甲殻類図鑑 (I), 保育社, 大阪, 261pp.
- Sano M., Minagawa M., Tamaki M., Hayashibara T., and Shimizu H., 2003: Effect of water temperature in the spawning interval of the kuruma prawn *Penaeus japonicus* after unilateral eyestalk ablation. *Suisanzoshoku*, **50**, 433-434.
- 武田正倫, 1995: エビ・カニの繁殖戦略, 平凡社, 東京, 339pp.

クルマエビにおける卵形成機構の解明

— 卵黄タンパク質合成の調節メカニズム —

会田勝美*

Hormonal control of vitellogenin synthesis in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*

Katsumi AIDA*

Abstract To develop new technologies for hormonal manipulation of shrimp reproduction, progress in the understanding of shrimp endocrinology is essential. In this study, complete cDNA sequence of vitellogenin (VTG, precursor of major yolk protein) of the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* was determined, and quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method for VTG mRNA was developed. VTG mRNA levels in the ovaries and hepatopancreas were high during the ovarian development, indicating that both organs actively produce VTG. For screening hormonal activity, an *in vitro* assay method was developed by determining the effects of hormones on VTG mRNA in the incubated ovarian fragment and inhibitory effect of the sinus-gland peptide (SGP 3) was found. The developed *in vitro* hormone assay method with the RT-PCR are useful for screening shrimp hormones, and the inhibitory activity of SGP 3 can be utilized for hormonal manipulation of shrimp reproduction.

Key words: kuruma prawn, vitellogenin, sinus gland, ovary, hepatopancreas

クルマエビは水産重要種であり、天然資源の維持と向上のために以前から種苗生産と放流が行われている。放流用の種苗生産では、産卵直前まで成熟した天然の雌エビを漁獲して採卵に用いている。防疫および遺伝的かく乱防止のため、親エビには放流予定地の地先で漁獲される成熟雌エビを用いることが望ましいが、天候や海況などの影響で地先の漁獲が減少したり、エビの成熟状態が悪かったりすると計画通りに種苗を生産できなくなるといった問題が生じている。こうした問題を回避するために、飼育したエビを成熟させて親エビとして利用したり、漁獲した雌エビの産卵率を高めたりする技術開発が求められている。しかし、まだ人為的な催熟技術は確立されていない。

催熟技術の開発には、まず卵形成過程とその調節機構を明らかにすることが重要である。これまでの研究では卵形成過程は主に組織学的に調べられており、卵黄タンパク質が卵母細胞に蓄積されて卵巣が発達し、卵黄蓄積終了後、表層胞が形成されて産卵に至ることがわかっている。一方、卵形成を調節する機構として、雌エビの眼柄を切除すると成熟が進むことから、眼柄内の神経節に存在するX器官／サイナス腺系が卵黄形成抑制ホルモンを合成・分泌していると考えられている。クルマエビのサイナス腺から複数のペプチドホルモンが精製され、その一部が卵巣のタンパク合成を抑制する活性を持つことが明らかになっている。しかし、卵形成過程での遺伝子発現の変化はまだ明らかになっ

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

* 東京大学大学院農学生命科学研究科 〒113-8657 東京都文京区弥生1-1-1 (Department of Aquatic Bioscience, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo, 1-1-1, Yayoi, Bunkyo, Tokyo 113-8657, Japan)

ておらず、また、サイナス腺ペプチドのタンパク質合成抑制活性も、卵黄タンパク質に特異的かどうか充分に確認されていない。

そこで本研究では、卵形成過程の中で卵黄タンパク質合成に注目し、卵黄タンパク前駆物質（ビテロジェニン）のcDNA塩基配列を使ってビテロジェニンmRNA量を測定する方法を開発し、卵形成過程とビテロジェニン合成活性との関連を明らかにした。次に、ビテロジェニンの合成器官である卵巣を培養し、ビテロジェニンmRNA量を指標としてホルモン活性を検定する方法を開発し、ビテロジェニン合成抑制活性をもつペプチドを見いだした。

肝臓のビテロジェニン

我々はこれまでにクルマエビの卵巣で発現しているビテロジェニンのcDNA全塩基配列の構造を決め、クルマエビではビテロジェニンmRNAが卵巣の濾胞細胞と肝臓で発現していることを見いだしている (Tsutsui *et al.*, 2002; Jasmani *et al.*, 2002)。本研究では、卵巣と肝臓で発現しているビテロジェニンが同一のものであるかどうか確認するために、肝臓で発現しているビテロジェニンのcDNA全配列を明らかにした (Tsutsui *et al.*, 2005b)。卵巣と肝臓で発現しているビテロジェニンの演繹アミノ酸配列を比較すると99.1%が同一であった。cDNA作製に用いた個体が違うため、0.9%の差は個体差による違いの可能性が高いと考えられ、同一個体では卵巣と肝臓で発現しているビテロジェニン遺伝子は同じであると推測される。

卵形成とビテロジェニン合成活性

他のエビ・カニ類では肝臓がビテロジェニンを合成しているのに対して、クルマエビ類では卵巣と肝臓がビテロジェニンを合成している (Wilder *et al.*, 2002)。卵巣と肝臓で合成されるビテロジェニンは同一のものと考えられるが、合成器官が二つあるということは、クルマエビでは卵巣発達において卵巣と肝臓が異なる役割を果たしている可能性が考えられる。卵巣と肝臓のビテロジェニン合成に対する役割を明らかにするために、ビテロジェニンmRNAの測定法（リアルタイムPCR法）を作製した後、卵形成過程におけるビテロジェニンmRNA量の変化を調べた (Tsutsui *et al.*, 2002, 2005b; Kim *et al.*, 2005)。

百島栽培センターの素ほり池で自然成熟した雌エビでは、卵形成の進行にともない生殖腺指数 (GSI) は8

近くまで上昇した (Fig. 1)。ビテロジェニン mRNA 相対値は、肝臓では卵形成過程後半で高い傾向を示したが、卵巣では前半に高い傾向を示した (Fig. 1)。また、未熟エビの眼柄を切除して成熟を誘発すると切除後14日でGSIは1.6近くまで上昇した (Fig. 2)。ビテロジェニンmRNA相対値は、卵巣ではGSIの上昇にともない増加したが、肝臓では明瞭な変化が見られなかった (Fig. 2)。ビテロジェニンmRNA相対値の変化が肝臓と卵巣で異なったことから、両器官は異なる調節を受け、卵形成前半では卵巣のビテロジェニン合成が重要だが後半では肝臓が重要になることが示唆された。

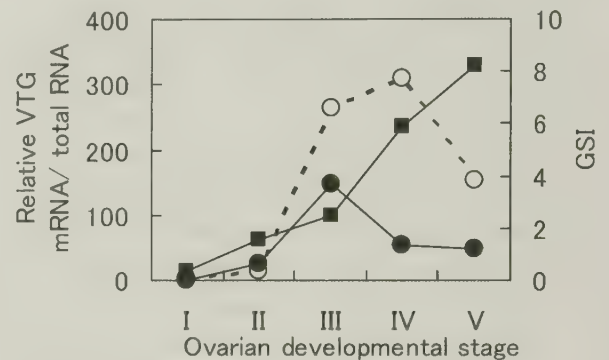


Fig. 1. Changes in gonadosomatic index (GSI, closed square) and relative vitellogenin (VTG) mRNA amounts in hepatopancreas (open circle) and ovary (closed circle) during ovarian development in female *Marsupenaeus japonicus*. I, previtellogenic ovarian stage; II, endogenous vitellogenic ovarian stage; III, early exogenous vitellogenic ovarian stage; IV, V, late exogenous vitellogenic ovarian stage.

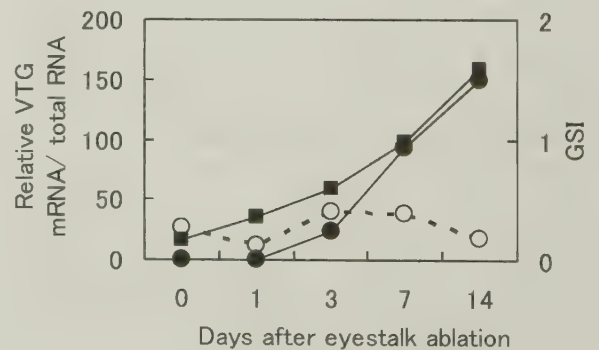


Fig. 2. Changes in gonadosomatic index (GSI, closed square) and relative vitellogenin (VTG) mRNA amounts in hepatopancreas (open circle) and ovary (closed circle) after eyestalk ablation in female *Marsupenaeus japonicus*.

ホルモン活性検定法

おわりに

未熟な雌エビから卵巢を切り出して細片にし、medium 199改良培地（塩類を調整して浸透圧を血液に合わせた）で24時間培養したところ、卵巢片中のグルタルアルデヒド三リン酸脱水素酵素（ハウスキーピングジーンのひとつ）のmRNA量は変化しなかったが、ビテロジェニンmRNA量は増加した（Tsutsui *et al.*, 2005a）。培養下では卵黄形成抑制ホルモンの作用がないため、ビテロジェニンmRNA量が増加したと考えられた。この培養法を利用して培養液に物質を添加することで、ビテロジェニンmRNA量に対する生理活性検定をすることが可能になった。

ビテロジェニン合成調節ホルモン活性

これまでにクルマエビのサイナス腺から7種類のペプチド（SGP1－7）が精製・同定されている。これらはいずれもアミノ酸配列から甲殻類血糖上昇ホルモン／脱皮抑制ホルモンファミリーに属することがわかっている。本研究ではこれらのうち、SGP3とSGP4のビテロジェニン合成に対する生理活性を卵巢片培養片を利用して検定した（Fig. 3, Tsutsui *et al.*, 2005a）。サイナス腺ペプチドのひとつSGP3はサイナス腺抽出物と同様にビテロジェニン合成を抑制したが、SGP4は明瞭な影響を示さなかった。SGP3がサイナス腺に含まれる抑制活性物質のひとつと考えられた。

本研究により、卵黄形成抑制活性をもつホルモンのひとつ明らかになった。成熟促進に応用するためには、この抑制ホルモンの合成・分泌または作用を抑える技術開発が必要となる。本研究で開発した生理活性検定法は今後のホルモン探索に役立つ。また、卵巢と肝臓のビテロジェニン合成に対する役割の違いが明らかになった。その調節の違いを明らかにするとともに、催熟技術開発に利用する必要がある。

本研究課題では卵黄タンパク合成について研究を進めたが、我々はクルマエビの卵形成の大きな特徴である表層胞の構成成分についても研究を進めている（Kim *et al.*, 2004, 2005）。表層胞を構成するタンパク質の遺伝子発現パターンやその合成調節機構はビテロジェニンと異なっており、表層胞形成について今後研究を進めることも、卵形成機構を理解する上で重要である。

文 献

- Jasmani S., Kawazoe I., Tsutsui N., Ohira, T., Aida K., and Wilder M. N., 2002: Identification of vitellogenin synthetic site in the kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Sci.*, **68**, Supplement I, 975-976.
- Kim Y. K., Kawazoe I., Tsutsui N., Jasmani S., Wilder M. N., and Aida K., 2004: Isolation and

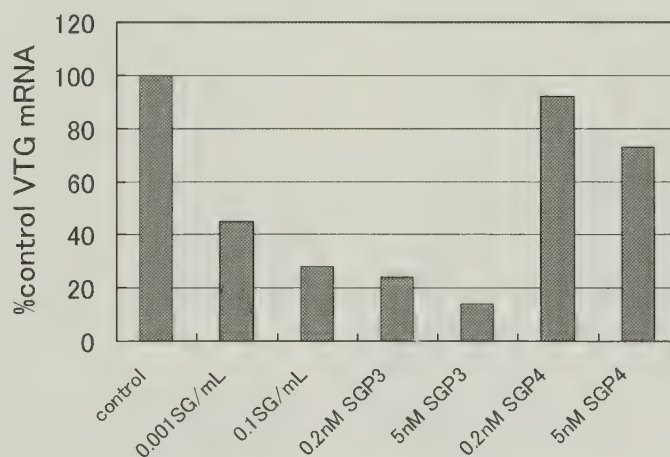


Fig. 3. Effects of sinus gland extract (SG) and sinus gland peptides (SGP3, SGP4) on vitellogenin (VTG) mRNA levels in incubated ovarian fragments. Paired ovarian fragments were taken from immature female prawn, and one fragment was incubated in medium (control) for 20 h, while the other fragment was incubated in medium containing a test substance (test) for 20 h. After incubation, VTG mRNA levels in the incubated fragment were determined, and data were expressed as ratio of test and control.

- cDNA cloning of ovarian cortical rod protein in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Crustacea: Decapoda: Penaeidae). *Zool. Sci.*, **21**, 1109-1119.
- Kim Y. K., Tsutsui N., Kawazoe I., Okumura T., Kaneko, T., and Aida K., 2005: Localization and developmental expression of mRNA for cortical rod protein (CRP) and vitellogenin (Vg) in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*. *Zool. Sci.*, **22**, 675-680.
- Tsutsui N., Katayama H., Ohira T., Nagasawa H., Wilder M. N., and Aida K., 2005a: The effects of crustacean hyperglycemic hormone-family peptides on vitellogenin gene expression in the kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **144**, 232-239.
- Tsutsui N., Kawazoe I., Ohira T., Jasmani S., Yang W. J., Wilder M. N., and Aida K., 2002: Vitellogenin of the kuruma prawn: the deduced primary structure and gene expression. *Fisheries Sci.*, **68**, Supplement I, 973-974.
- Tsutsui N., Kim Y. K., Jasmani S., Ohira T., Wilder M. N., and Aida K., 2005b: The dynamics of vitellogenin gene expression differs between intact and eyestalk ablated kuruma prawn *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus*. *Fisheries Sci.*, **71**, 249-256.
- Wilder M. N., Subramoniam T., and Aida K., 2002: Yolk proteins of Crustacea. In "Reproductive Biology of Invertebrates" (ed. By Raikhel A. S. and Sappington T. W.), Vol XIIA, Science Publishers, Enfield, pp.131-174.

クルマエビの卵の発達過程を探る

— 成熟卵を特徴づける物質の生合成過程の解明 —

山野恵祐*・鶴沼辰哉*

Oocyte development of kuruma prawn: process of biosyntheses of yolk materials

Keisuke YAMANO* and Tatsuya UNUMA*

Abstract A deep understanding of gonadal development and its controlling mechanism is indispensable for establishing the method of inducing maturation. In this study the process of cortical rods formation, which occurs at the final stage of oocyte maturation in penaeid shrimps, was examined. The expression of a gene for a cortical rod protein, the translation into proteins and the assembly of the protein to form cortical rods take place at the different stages of oocyte development. The gene for a certain proteolytic enzyme is stage-specifically expressed in oocytes at the early stage of cortical rod formation.

Key words: kuruma prawn, ovary, yolk protein, thrombospondin, cathepsin

クルマエビは比較的長い繁殖期を有し、国内においては概ね春期から秋期にかけて卵巣の発達した成熟個体が漁獲される。また、クルマエビは同一繁殖期間内に繰り返して産卵する多回産卵型の繁殖様式をもち、そのため発達中の卵巣内には発達段階の異なる卵群が存在する。一方、天然採捕したクルマエビを飼育下に移したとき、水槽内で成熟させたり、成熟状態を維持することは容易ではない。そのため種苗生産に用いる親エビには、漁獲物から産卵直前にまで成熟した雌個体を選別し、速やかに産卵させることで受精卵を得ている。しかしこのような採卵手法では、天然エビの完熟個体の出現や漁獲の状況などによって種苗生産の開始が左右されることから、より安定的に採卵するための技術開発が望まれている。

催熟技術を構築するに当たっては、対象生物の成熟過程やそれをコントロールしている仕組みを理解することは欠かせない。成熟が始まる前の卵巣は非常に小

さく、体重に対する卵巣重量比（GSI）は1％に満たない。このような卵巣中には多数の卵黄をもたない若い卵母細胞が存在する。成熟が始まると卵内には卵黄が蓄積されはじめ、卵径は急激に増大する。このとき蓄積される卵黄物質のうち最も主要なものはビテリンである。ビテリンはそれ自身が胚発生時の栄養源となるばかりではなく、脂質、カロテノイド、金属などを結合して卵内に持ち込む輸送体としての役割も有している。ビテリンは前駆物質、ビテロジェニン（Vg）として生産されるが、クルマエビのVg遺伝子は甲殻類で最初にクローニングされた（Tsutsui *et al.*, 2000）。クルマエビVg遺伝子の発現部位は卵巣の濾胞細胞と肝臓であることも明らかにされている（Tsutsui *et al.*, 2000）。また、未熟な個体の眼柄を切除するとVg遺伝子の発現が高まることから、Vg遺伝子の発現は眼柄内にあるX器官で作られる眼柄ホルモンによって調節されていると考えられている。卵黄蓄積を完了した卵巣

2005年11月15日受理（Received: November 15, 2005）

* 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1（National Research Institute of Aquaculture, 422-1, Nakatsuhamaura, Minamimise, Mie 516-0193, Japan）

のGSIはおよそ10%に達する。クルマエビ類の卵発達に特異的なこととして、卵黄蓄積を終えた卵の表層に表層桿状体が形成される。表層桿状体は、産卵して卵が海水に触れたときに、卵外に放出されて、卵を取り囲むゼリー層を形成する。表層桿状体の主成分はタンパク質であり、複数のタンパク質から構成されているが、そのうちの1成分が同定されている (Khayat *et al.*, 2001)。表層桿状体の形成終了後、卵核胞が崩壊し、排卵、産卵に至るが、このプロセスは短期間のうちに進行し、通常、表層桿状体の形成開始から産卵まで1–2日の内に終える。

このような卵発達過程と現在行われている採卵手法による産卵誘発の正否には重要な関連がみられる。親エビには目視で卵巣の良く発達した個体を選別したものを使用するが、この選別手法でより分けられたエビの中には、表層桿状体を形成している個体と形成していない個体が含まれる。そして表層桿状体形成個体は高率で産卵に至るが、非形成個体では産卵率は低く、しばしば卵巣の退行が起こる (水藤ら, 1996)。従って、表層桿状体の形成機構やこの時期の卵内で起こっていること明らかにすることは効率的な採卵手法を開発するうえで重要な情報を与えると考えられる。

このようなことから本研究では、クルマエビの卵発達の過程のうち、特に産卵間近の表層桿状体形成期を対象として、分子生物学的な手法を用いてその詳細を明らかにすることを目的にした。

表層桿状体形成の過程

表層桿状体は比較的強固な物性をもっており、表層桿状体を形成している卵巣を磨り潰しても表層桿状体は元の形状を保っている。そのため磨り潰した卵から遠心操作により表層桿状体を容易に粗精製できる。このようにして得た表層桿状体のタンパク質構成を、SDSポリアクリルアミド電気泳動法で解析した結果、主要な成分として5成分あり、それらの分子量はおよそ210, 150, 140, 130, 30 kDaであることが分かった (Fig. 1 b) (Yamano *et al.*, 2003)。クルマエビにおいて表層桿状体タンパク質の1成分がperitrophin様物質として同定されているが (Khayat *et al.*, 2001)、分子量から推定すると30 kDa成分がそれに相当すると思われた。

クルマエビ表層桿状体タンパク質を特異的に検出する手法を開発するために、表層桿状体を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。ウェスタンブロット (WB) 法で抗体の反応性をみると、多くのロットの抗体 (21/32株) は150, 140, 130 kDaタンパク質を同時

に検出することから、これら3成分は非常に類似した分子であると推測された (Fig. 1 c,d)。このうち4株の抗体は30 kDaタンパク質にも弱い反応性を示し (Fig. 1 c)、30 kDaタンパク質と150–130 kDaタンパク質の間にも類似性があると考えられた (Yamano *et al.*, 2003)。

150–130 kDaタンパク質に対する抗体を用いて卵巣組織を免疫染色すると、表層桿状体のみならず、表層桿状体を形成する前の卵黄蓄積期の卵黄も染め出された (Yamano *et al.*, 2003)。さらにWB法で各卵巣発達段階を調べたところ、成熟開始直後からこのタンパク質が検出された (Fig. 2) (Yamano *et al.*, 2004)。従って、150–130 kDaタンパク質は表層桿状体が形成される時期ではなく、それよりずっと以前の成熟開始時に生産が始まり、卵黄として蓄積されていることが明らかになった。

次いで150 kDaタンパク質の部分アミノ酸配列を決定し、その情報を利用して遺伝子の塩基配列を決定した。遺伝子データベースに登録されている情報との相同性解析から、150 kDaタンパク質は細胞外基質タンパク質として知られるthrombospondin (TSP) であることが判明した。また遺伝子クローニングの過程で、部分的に塩基配列の欠損した2つのサブタイプがあることが分かり、免疫学的な類似性を考え合わせて、これらが140, 130 kDaタンパク質をコードすると結論付けた (Yamano *et al.*, 2004)。またクルマエビTSPのアミノ末端領域はクルマエビperitrophin様タンパク質とも高い類似性を持っていた。クルマエビの表層桿状体は将来卵外に放出されてゼリー層を形成することを考えると、TSPはゼリー層の構造の形成に関わっているのかもしれない。

定量PCR法を用いて成熟の進行に伴う卵巣内でのTSP遺伝子の発現量の変化を調べたところ、興味深いことに、成熟段階による発現量の違いは見出されず、未熟な卵巣においてさえ成熟期と同じようなレベルで検出された。さらに組織学的な手法を用いて卵の発達ステージ毎のTSPメッセンジャーRNAの存在をみると、卵原細胞から卵母細胞に移行直後の極めて未熟な卵母細胞で検出されはじめ (Fig. 3 a)、卵黄蓄積を開始する以前の卵母細胞 (初期周辺仁卵, 周辺仁卵) において強く検出された (Fig. 3 b)。卵黄蓄積が始まると、急激に弱く検出されるようになり、卵黄蓄積が進んだ卵では全く検出されなかった (Fig. 3 c) (Yamano *et al.*, 2004)。

以上のような結果から表層桿状体の形成過程は以下のように取りまとめられる。TSP遺伝子の発現は未熟な卵巣において卵母細胞に移行直後の若い卵母細胞で

起こる。TSP遺伝子の発現は卵黄蓄積開始前の卵細胞内で継続し、メッセンジャーRNAのまま保持されている。成熟が始まると、卵黄蓄積期の初期からTSPタンパク質への翻訳が開始して、TSPタンパク質は卵黄成分として蓄積される。一方そのような卵内でのTSP遺伝子発現は停止する。卵黄蓄積期が終了すると、卵黄として蓄積されたTSPタンパク質を材料にして表層桿状体が形成される。このようにTSP遺伝子の発現、タンパク質への翻訳、表層桿状体構造の形成は明確に異なる成熟段階において起こることが明らかとなった。

おそらく、それぞれのステップへの移行は異なる調節の仕組みのもとにあると考えられる。そのことを調べるために、未熟なクルマエビの眼柄を切除し、TSP遺伝子及びタンパク質の発現量の変化をみた。その結果、TSPタンパク質への翻訳は促進されたものの、TSP遺伝子の発現量に変化はみられなかった。このことからTSPタンパク質への翻訳開始は眼柄ホルモンの支配下にあると想像される。遺伝子発現及び表層桿状体形成の調節機構の解明は今後の残された課題である。

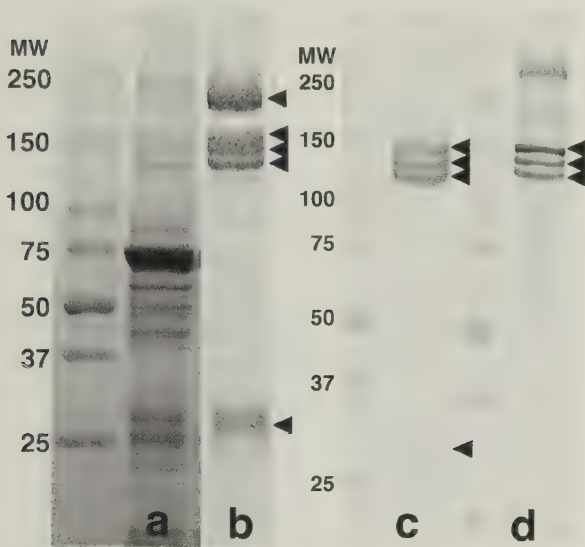


Fig. 1. SDS-PAGE patterns of ovary extract (a) and cortical rod isolate (b), and Western blot analysis of cortical rod proteins by two different lots of monoclonal antibodies (c and d). Arrowheads indicate major components of cortical rod proteins. MW, molecular weight markers. This figure is modified from Yamano *et al.* (2003).

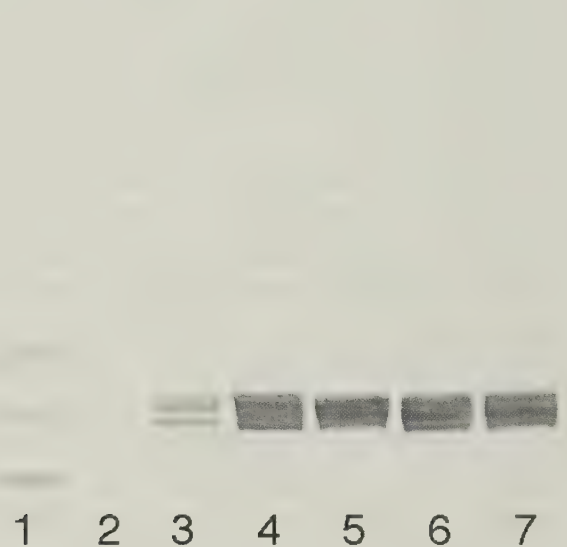


Fig. 2. Western blot analysis of 130-150 KDa proteins at various ovarian stages. 1, molecular weight markers of 250, 150 and 100 KDa from the top; 2, immature stage; 3, oil globule stage; 4 and 5, yolk granule stage; 6 and 7, cortical rod stage. This figure is modified from Yamano *et al.* (2004).

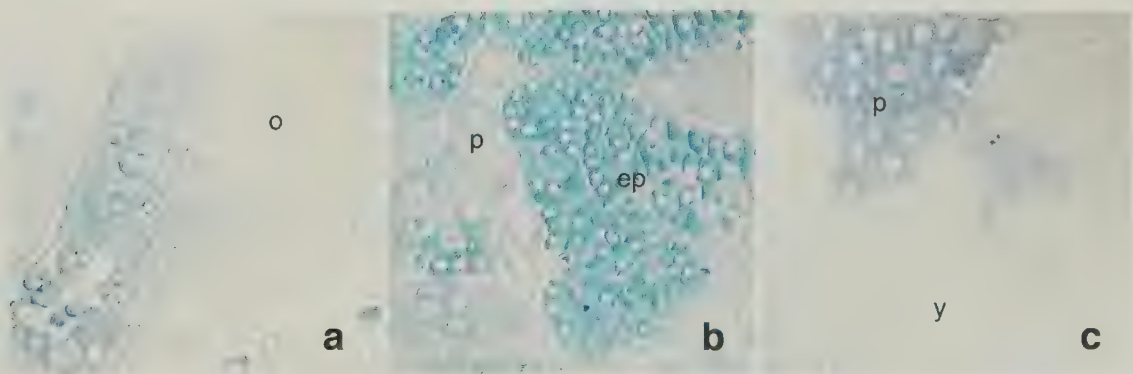


Fig. 3. Expression of thrombospondin gene visualized by in situ hybridization. a, Germinative zone; b, immature ovary; c, oil granule stage; o, oogonia; ep, early perinucleolus stage oocyte; p, perinucleolus stage oocyte; y, yolk granule stage oocyte. This figure is modified from Yamano *et al.* (2004).

最終成熟期に特異的に発現する遺伝子

クルマエビの卵発達の最終段階では、表層桿状体の形成、卵核胞の崩壊、排卵、産卵といった一連の生理現象が連続して起こるが、これらに内在する分子機構は全く分かっていない。そこで、最終成熟期に卵巣内で特異的に発現する遺伝子を探索することを通じて、最終成熟の仕組みについての理解を深めること目指した。

分子生物学的に時期特異的な発現をする遺伝子を選別する手法（cDNAサブトラクション法）を用いて、表層桿状体形成期に発現している遺伝子の割合を高めた遺伝子ライブラリを作製した。次いでドットプロット法及び定量PCR法を用いて成熟に伴う発現パターンを確かめたところ、明瞭な時期特異的な発現を示す遺伝子が1つ単離された。

この遺伝子の全塩基配列を決定した結果、カテプシンCをコードする遺伝子であることが判明した（Qiu and Yamano, 2005）。一般にカテプシンCは細胞内のライソゾームに内在する蛋白分解酵素として知られている。

クルマエビ卵巣におけるカテプシンC遺伝子の発現は卵黄蓄積期には低レベルにあるが、表層桿状体形成の初期（球形の表層桿状体が観察される時期）に急激に亢進した（Fig. 4）。表層桿状体形成中期（桿状の表層桿状体）には発現量はやや低下し、後期（GVBDの起こった卵）にはほとんど表層桿状体を形成する以前のレベルに戻った。表層桿状体の形成過程の時間経過を考えると、この遺伝子の強い発現期間は1日以下と思われる（Qiu and Yamano, 2005）。

次いで、遺伝子塩基配列から演繹されたアミノ酸配列をもとに合成ペプチドを作製し、それを抗原としてカテプシンCに対する特異抗体を得た。それを用いてWB法で卵巣発達段階毎にカテプシンCタンパク質の存在をみたところ、表層桿状体期（初期、中期、後期）にのみ検出された。カテプシンCは前駆体として合成され、プロセッシング（分解）を受けることで活性型になることが知られているが、検出されたのは非活性型のみであった。さらに免疫組織学的な観察から、カテプシンCタンパク質は表層桿状体に局在することが分かった（Fig. 5）（Qiu and Yamano, 2005）。

カテプシンCのクルマエビ卵巣における生合成過程をまとめると、カテプシンC遺伝子は表層桿状体形成の初期から中期にかけて時期特異的に発現し、速やかにタンパク質へと翻訳される。合成されたカテプシンCタンパク質は表層桿状体の構成成分となり、非活性型のまま存在する。

表層桿状体が産卵時に卵外に放出されジェリー層を形成する際、表層桿状体の崩壊とジェリー層への再構築が起こる。この過程には蛋白分解酵素が必要なことが報告されていることから、この現象にカテプシンCが関与しているのかもしれない。また、甲殻類の卵形成の最終段階に特異的に発現する遺伝子が初めて単離されたが、この遺伝子発現を促す因子が何であるかについては、生殖生理学的な側面からも催熟技術の開発への応用を考えたときにも興味を持たれる。

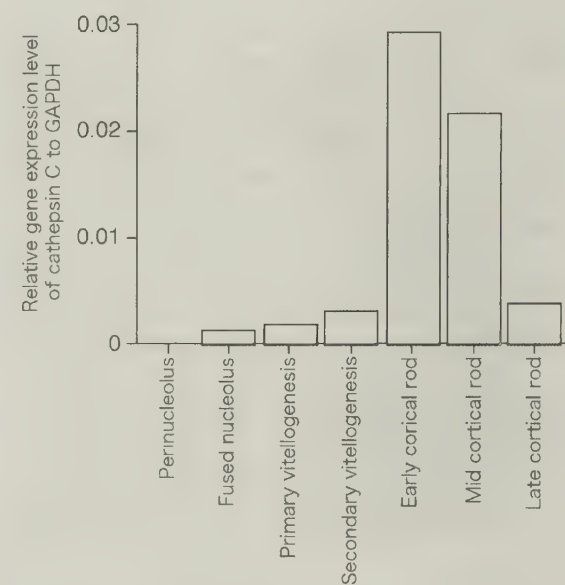


Fig. 4. Expression levels of cathepsin C gene at various ovarian stages. This figure is modified from Qiu and Yamano *et al.* (2004).

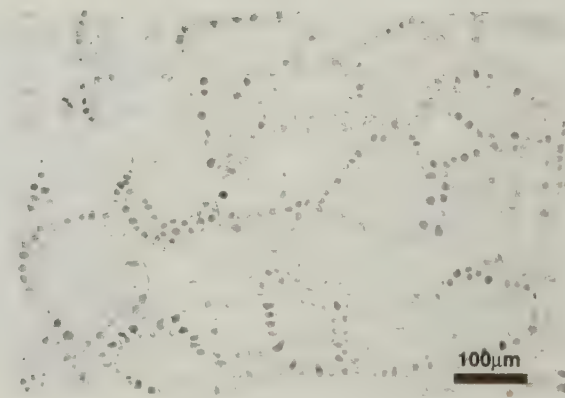


Fig. 5. Immunostaining of cathepsin C in the ovary at the cortical rod stage.

おわりに

以上のようにクルマエビ卵形成の最終期に起こる表層桿状体の形成とカテプシンCの生合成の過程を明らかにした。本研究では、現象面からは詳細に捉えることができたものの、これらの現象を調節している機構の解明には至らなかった。クルマエビの成熟をコントロールすることを目指すうえで、調節機構を明らかにすることが今後の最も重要な鍵となってくる。

文 献

Khayat M., Babin P.J., Funkenstein B., Sammar M., Nagasawa H., Tietz A., and Lubzens E., 2001: Molecular characterization and high expression during oocyte development of a shrimp ovarian cortical rod protein homologous to insect intestinal peritrophins. *Biol. Reprod.*, **64**, 1090-1099.
 Qiu G.-F., Yamano K., and Unuma T., 2005: Cathepsin C transcripts are differentially expressed in the final stages of oocyte maturation in kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*.

Comp. Biochem. Physiol. (B), **140**, 171-181.

水藤勝喜, 荒川哲也, 伊藤英之進, 1996: 生検法 (Biopsy法) による種苗生産用親クルマエビの成熟度観察. 栽培技研, **25**(1), 27-35.

Tsutsui N., Kawazoe I., Ohira T., Jasmani S., Yang W., Wilder M. N., and Aida K., 2000: Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Zool. Sci.*, **12**, 651-660.

Yamano K., Seto H., Qiu G.-F., and Unuma T., 2003: Immunological characterization of cortical rod proteins of kuruma prawn, *Marsupenaeus japonicus*. *Comp. Biochem. Physiol. (A)*, **136**, 371-377.

Yamano K., Qiu G.-F., and Unuma T., 2004: Molecular cloning and ovarian expression profiles of thrombospondin, a major component of cortical rods in mature oocytes of penaeid shrimp, *Marsupenaeus japonicus*. *Biol. Reprod.*, **70**, 1670-1678.

シラスウナギの人工生産へ向けて

ウナギサブチームリーダー
鵜沼辰哉*

Studies toward artificial production of glass eel

Tatsuya UNUMA*

ウナギの養殖に用いられる種苗は全て天然のシラスウナギである。日本国内におけるシラスの採捕量は年によって増減を繰り返しながらも長期的には減少を続け、慢性的な種苗不足と大幅なシラス価格の変動が養鰻業の経営を圧迫している。加えて、中国等から輸入される安価な養殖ウナギに押されて国産養殖ウナギの価格も低迷し、日本国内の養殖ウナギ生産量は1980年代後半をピークとして、以後は減少を続けている。このような背景から、ウナギの成熟を制御し、種苗を人工的に生産する技術の実現が強く求められている。

本プロジェクト開始時までの状況

ウナギの種苗生産は極めて困難と考えられてきたが、その理由のひとつとして、天然魚の生活史に未解明な部分が多いことが挙げられる。例えば、ウナギ卵や成熟した親ウナギは天然において過去に一度も観察された例がない。親魚の催熟や仔魚の飼育等の各工程において問題に突き当たったとき、手本とするべき天然魚のデータが極めて乏しいことから、経験に頼って手探りで研究を進めざるをえない。

ウナギは通常の飼育環境下においては成熟も産卵もしない。ウナギの卵や精子を得るには、親ウナギにホルモンを投与し、人為的に卵形成・精子形成を促すことが必須である。日本におけるウナギの人為催熟に関する研究はすでに40年以上の歴史をもち、本プロジェクト開始時（2001年）までに、雌へはサケ脳下垂体抽出液と卵成熟誘起ステロイド、雄へはヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを注射することにより、卵や精子を確保する技術は確立されていた。しかしながら、得られる卵の質にはばらつきが大きく、人工授精を行ってもほとんど受精しないこともあり、仔魚が大量にふ化する良質卵を得られるのは比較的稀であった。また、天然における仔魚の餌が未だ不明であることから、ふ化仔魚の飼育も困難を極め、試行錯誤の末に考案されたサメ卵を主体とした液状飼料によって、ようやくレプトケファルス幼生（シラスウナギに変態する前の柳の葉型の幼生）にまで育てることに成功したばかりであった。

本プロジェクトでの研究内容

以上のような状況から、ウナギの種苗生産を実現するためには当面の目標として、「良質な卵を確実に得られるようにすること」及び「仔魚をシラスウナギまで飼育できるようにすること」が重要と考えられた。そこで、ウナギサブチームではこれらの目標を達成するために、6つの研究課題によって主として下記のような研究内容に取り組むこととした。

- （1）親魚養成の方法を改善して養成期間を短縮するとともに、卵質を高める。
- （2）人為催熟の方法を改善して卵質を高める。
- （3）卵質にも影響すると考えられる卵黄蛋白質分解による浮遊性獲得過程を明らかにする。

* 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

- (4) 卵質判定手法を確立したうえで、どのような要因で卵質が決まるのかを明らかにする。
- (5) 消化器官をはじめとする仔魚の体の作られる過程を明らかにする。
- (6) 仔魚の餌と飼育方法を改善する。

3年間の研究によって、親魚の養成と催熟、卵質の判定、仔魚の飼育などにおいて新たな基礎知見の蓄積と技術の改善が行われ、結果として世界で初めてシラスウナギを人工的に作り出すことに成功した。各課題における具体的な研究成果は、以後の各論文において課題担当者が詳しく紹介する。

ウナギ親魚および卵の効率的な確保を目指して

— 若齢魚からの採卵と卵脂肪酸に及ぼす親魚飼料の影響 —

山田 智^{*1}・堀 勝彦^{*2}・瀬岡 学^{*3}

Toward the improvements of broodfish management and egg quality of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, for larviculture - egg collection from young broodfish and effects of broodfish diet on egg fatty acid contents -

Satoshi YAMADA^{*1}, Katsuhiko HORI^{*2}, and Manabu SEOKA^{*3}

Abstract It is essential for the progress of the study on the eel larviculture to obtain broodfish and eggs more efficiently. The Japanese eel broodfish are grown up for several years under the misapprehension that larger and older fish produce eggs with high quality. In the present study, we revealed that high quality eggs can be obtained from younger and smaller broodfish. In addition, we showed that egg fatty acid profile, one of nutritional determinants of fish egg quality, can be altered by the manipulation of dietary fatty acids for the young broodfish. The results obtained here may help considerably in improvements for broodfish management and egg quality in the study on the larviculture.

Key words: eel, broodfish, broodfish diet, egg fatty acid

ウナギは「土用の丑」で知られるように、長年にわたり日本人の食文化の一端を担ってきた。そして、古くからウナギ養殖が活発に行われ、現在では本邦における重要な養殖産業にまで発展している。しかし、養殖のための種苗は日本沿岸に出現するシラスウナギを採捕して賄っているのが現状で、ブリやマグロなどとともに未だ種苗を天然産に依存している珍しい養殖魚種である。また、日本のみならず東南アジアの各国がシラスウナギを採捕し養殖種苗として用いることがシラスウナギ天然資源量を左右する大きな要因の一つと考えられており、それに伴う種苗の価格変動も養鰻漁

家の計画的な生産を妨げている。また、種苗価格の変動は蒲焼などの小売価格にも反映されることから、小売事業者のみならず消費者に対する経済的影響も無視できない。したがって、これらを解決するには天然種苗に頼らない人工種苗の生産が欠かせない技術となる。そして、この観点に立って行われてきたウナギ種苗生産に関する研究はここ10年で大きな進歩を遂げ、(独)水産総合研究センター養殖研究所ではサケ脳下垂体抽出液やステロイドホルモンを用いた催熟・採卵技術の開発に続き (Kagawa *et al.*, 2001), ついに2003年には卵からシラスウナギを経て稚魚まで飼育することに

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

^{*1} 愛知県水産業振興基金栽培漁業部 〒441-3615 愛知県田原市小中山町一膳松 1-3 (Aichi Fish Farming Institute, Ichizenmatsu, Konakayama, Tahara, Aichi 441-3615, JAPAN)

^{*2} 愛知県農林水産部水産課 〒460-8501 名古屋市中区三の丸 3-1-2 (Fisheries Administration Division, Department of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Aichi Prefectural Government, Sannomaru, Naka-ku, Nagoya, Aichi 460-8501, Japan)

^{*3} 近畿大学水産研究所 〒649-5145 和歌山県東牟婁郡智勝浦町浦神 468-3 (Fisheries Laboratory, Kinki University, Urugami, Nachikatsuura, Wakayama 649-5145, Japan)

世界で初めて成功した (Tanaka *et al.*, 2003)。

しかし、一方でウナギの種苗生産研究に用いられている親魚は大型で、育て上げるまでには2～3年と長期間を要し、人為催熟して得られる卵の状態が劣悪であることが多いために卵自体やふ化した仔魚の生き残りも良くないなどの問題点も解決されないまま残っている。したがって、これまで以上に成熟・産卵と仔稚魚飼育に代表されるウナギ種苗生産研究を推し進め、天然産種苗に依存しない人工種苗を生産するための基礎知見を得るには、親魚飼育期間の短縮化や健全な仔魚が得られる良質卵の確保のような効率化のための技術開発が望まれる。

本研究ではこれらの理由から、飼育期間が従来よりも極めて短期間ですむ小型の若齡魚を人為催熟して採卵が可能かどうか、また異なる油脂を添加した親魚飼料をウナギに与えることで、魚類では卵質に大きく関わると考えられている卵の脂肪酸、ひいては卵質に影響を与えるかどうかを調べることを目的とした。

若齡魚からの採卵

ウナギをハウス養鰻など従来の養殖方法で飼育すると、原因は不明であるが多くの個体が雄になり、雌はごく少数しか現れない (千葉, 岩田, 1999)。したがって、現在では種苗生産研究に必要な雌個体を多く得るため、シラス期から性ホルモンの一種であるエストラジオール-17 β を約6ヵ月間経口投与してウナギを雌性化する (立木ら, 1997)。このように人為的に雌性化された若齡魚が、すでにその時点で人為催熟すること

ができるのであれば、従来のように長い期間をかけて育て上げなくともより短期間で親魚を確保できることになり、種苗生産研究をさらに一層効率的に進めることができると考えた。

そこで、シラス期からエストラジオール-17 β を経口投与して雌性化したウナギ15尾 (投与区; 平均体重約760g; シラス期から約14ヵ月飼育)、およびこれらと同由来であるがエストラジオール-17 β を投与せずに雌となった19尾 (無投与区; 平均体重約650g) を、海水馴致した後はサケ脳下垂体抽出液を毎週1回注射して採卵を試みた (Kagawa *et al.*, 2001)。

その結果、無投与区では7尾 (37%) からのみ採卵できたのに対し、投与区ではほぼ全数の14尾 (93%) から卵が得られた。また、採卵までに要したサケ脳下垂体抽出液の投与回数は無投与区で9～13回 (平均11回)、投与区では7～11回 (平均9回) であり、投与区では採卵時期が早まる傾向にあった (Fig. 1)。したがって、エストラジオール-17 β で雌性化した個体は、若齡魚でもサケ脳下垂体抽出液に良く反応して成熟することが分かった。

この理由は不明であるが、エストラジオール-17 β の投与は生殖腺を卵巣へと分化させるだけでなく、サケ脳下垂体抽出液やそれに誘導される内因性ホルモンに対する生殖器官の感受性をも高めるのかもしれない。今後に残された興味ある検討課題である。いずれにしても本研究結果から、従来よりもウナギ親魚の飼育期間を大幅に短縮することができる技術が開発されたことから、ウナギ種苗生産研究をさらに一層効率的に進めることができるものとする。

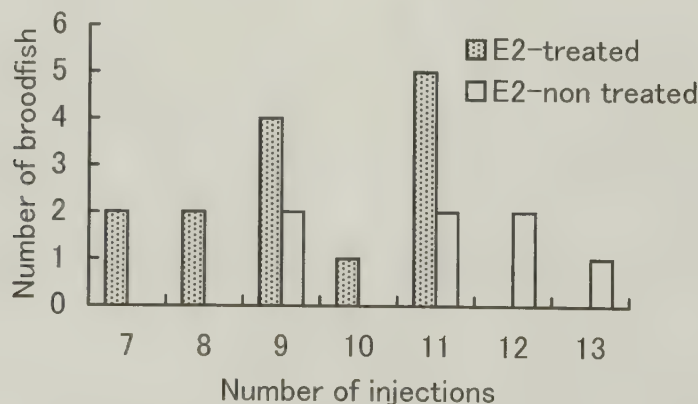


Fig. 1. Number of salmon pituitary extract injections in young eel treated with or without estradiol-17 β . Bars show the number of broodfish with ovulation.

卵脂肪酸組成に及ぼす親魚飼料の影響

魚類の卵質は様々な要因を受け決定されるが、なかでも親魚が摂取した栄養素の影響を受けることが良く知られている (Kjørsvik *et al.*, 1990)。したがって、ウナギの卵質が安定しないのは、人為催熟によるホルモンの乱れやストレスのほかに、親魚飼料の栄養素も大きく関わっている可能性は十分に考えられる。ウナギは成長に伴い摂餌活性が低下することから、これまで親魚飼料に関する研究はほとんど行われていなかった。しかし、シラス期からの飼育期間が約1年のウナギは活発に摂餌することから、先に述べた若齢魚の成熟・採卵技術の確立は親魚飼料に関する研究を行う上でも極めて有効なツールになると考えた。魚類の卵質に影響を与える親魚飼料の栄養素には脂肪酸、ビタミン、カロテノイドなどがある (Kjørsvik *et al.*, 1990)。ここでは親魚飼料の脂肪酸組成の違いが卵の脂

肪酸組成と卵質に及ぼす影響について検討した。

先述と同じ方法で雌性化したウナギ (平均体重119g：シラス期から7ヵ月飼育) を、400尾ずつ2群に分け、それぞれにn-6系脂肪酸のリノール酸 (18:2n-6) を多く含むヒマワリ油、あるいはn-3系脂肪酸のドコサヘキサエン酸 (22:6n-3) を多く含むカツオ油を添加した養鰻用飼料を与えて約3ヵ月間飼育した (Table 1)。飼育はウナギの成熟を促進する海水中で行った (Kagawa *et al.*, 1998)。飼育終了後は各飼料区から22尾を無作為に選び出し、サケ脳下垂体抽出液の反復注射により人為催熟して採卵するとともに (Kagawa *et al.*, 2001)、得られた採出卵については受精率やふ化率など卵質評価指標の測定と脂肪酸分析を行った。

飼育期間中は両飼料区とも活発に摂餌して、飼育終了時における平均体重はいずれも約330gと等しかった。また、人為催熟に要したサケ脳下垂体抽出液の投与回数にも区間差や従来との結果との差は認められなかった

Table 1. Formula and proximate and fatty acid compositions of diets

	Diet	
	Sunflower oil	Bonito oil
Ingredients (%)		
Commercial mash	100	100
Sunflower oil	7	-
Bonito oil	-	7
Tap water	130	130
Proximate composition		
(% dry)		
Crude protein	48.3	47.8
Crude fat	13.8	13.9
Sugar	22.0	21.3
Crude ash	13.0	12.8
Fatty acid composition		
(% of total fatty acid)		
14:0	1.8	3.7
16:0	11.0	19.2
16:1	2.3	5.4
18:0	4.6	5.5
18:1n-9	21.8	13.9
18:1n-7	0.7	2.8
18:2n-6	39.7	1.4
18:3n-3	0.5	0.4
20:4n-6	0.4	1.5
20:5n-3	3.5	7.1
22:6n-3	4.8	20.5

ことから、若齢魚を用いることで親魚飼料を活発に摂取させることができるとともに、人為催熟も順調に行えることを再確認した。

そして、これらの親魚から採卵を試みたところ、ヒマワリ油区からは17尾、カツオ油区からは19尾とほぼ同数の親魚から卵が得られた (Table 2)。また、両飼料区の浮上卵率、受精率、ふ化率および採卵数もそれぞれ 40%、23%、10%および700粒/g 魚体重前後で明確な差異は認められなかった (Table 2)。一方、卵の脂肪酸組成についてみると、親魚飼料の脂肪酸組成と同様に、ヒマワリ油区ではリノール酸が、またカツオ油区ではドコサヘキサエン酸が多く、区間差が認められた (Fig. 2)。

以上の結果から、卵の脂肪酸組成は親魚飼料のそれを反映し変動するが、本研究で用いた親魚飼料では卵

質に明確な差は見出されなかった。本研究で使用したヒマワリ油あるいはカツオ油を添加した親魚飼料はいずれもウナギの必須脂肪酸要求を満たしている (竹内ら, 1980)。おそらく、脂肪酸要求を満たす飼料を親魚が摂取していれば、食餌性脂肪酸の違いが卵の脂肪酸組成に反映したとしても、ウナギの卵質はさほど影響を受けないのかもしれない。しかし、本研究で用いたヒマワリ油やカツオ油とは脂肪酸組成が異なる種々の油脂も存在することから、今後はこれらについても検討を加え、卵脂肪酸、ひいては卵質に及ぼす親魚飼料の影響を調べる必要があるだろう。一方、本研究結果から、親魚飼料を通して卵の生化学成分を改変できることがウナギでも明らかになった。脂肪酸以外に魚類の卵質に関わるとされるビタミン E、ビタミン C、アスタキサンチンなどの親魚飼料への添加効果についても興味を持たれる。

Table 2. Performance of artificial insemination in sunflower oil-fed and bonito oil-fed groups

	Dietary group	
	Sunflower oil	Bonito oil
No. of female broodfish used for insemination	22	22
No. of female broodfish with ovulation	17	19
Buoyancy (%)	37.1±34.9*	40.9±37.1
Fertilization (%)	23.8±43.0	22.9±20.9
Hatching (%)	9.7±13.5	14.0±20.4
Relative amount of eggs striped (eggs/g fish BW)	749.0±171.3	665.6±213.3

*Mean±SD.

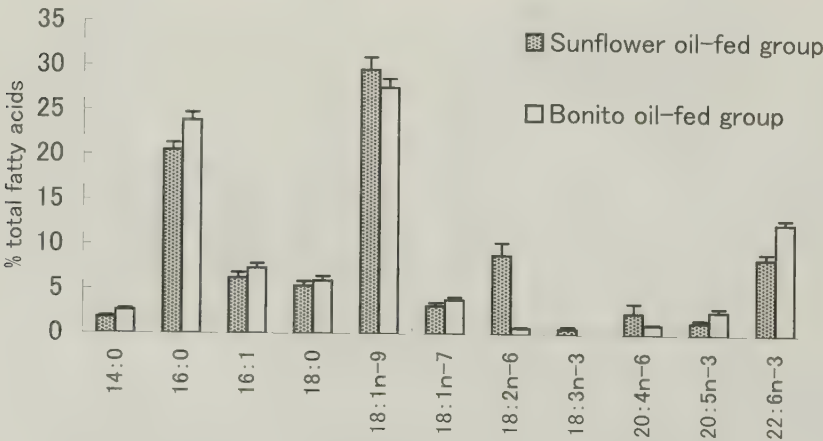


Fig. 2. Egg fatty acid composition in the sunflower oil-fed and bonito oil-fed groups.

おわりに

以上の本研究結果から、若齢の親魚を用いて人為催熟・採卵が可能ことが明らかとなった。また、卵質には明瞭な影響は認められなかったものの、親魚飼料の脂肪酸組成が卵の脂肪酸組成に反映することを示した。卵質を改善するまでには至らなかったが、本研究で得られたこれらの知見は、ウナギ親魚および卵の効率的な確保を目指すうえで、有用な示唆を与えるものと考えられる。

文 献

- 千葉洋明, 岩田宗彦, 1999: ウナギの性: 雌雄は環境によって変わるか. 月刊海洋, **31**, 297-303.
- Kagawa H., Inuma N., Tanaka H., Ohta H., and Okuwaza K., 1998: Effect of rearing period in seawater on induce maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **64**, 77-82.
- Kagawa H., Ohta H., and Tanaka H., 2001: Recent progress of research on larval production of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Suisanzoshoku*, **49**, 127-132.
- Kjørsvik E., Jensen A. -M., and Holmefjord I., 1990: Egg quality in fishes, in "Advances in Marine Biology" (ed. by Blaxter J. H. S. and Southward A. J.), Academic Press, London, pp. 71-113.
- 立木宏幸, 中川武芳, 田村憲二, 広瀬慶二, 1997: ニホンウナギにおける estradiol-17 β の経口投与による雌化効果, 成長および親魚養成. 水産増殖, **45**, 61-66.
- 竹内敏郎, 新井 茂, 渡部 武, 新間弥一郎, 1980: ウナギの必須脂肪酸要求量. 日水誌, **46**, 345-353.
- Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., Unuma T., and Nomura K., 2003: The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 493-497.

ウナギの卵成熟・排卵および卵質に及ぼす要因の解明

香川浩彦*

Studies on factors affected in induced oocyte maturation, ovulation and egg quality in Japanese eel

Hirohiko KAGAWA*

Abstract For stable production of eel seedlings, it is necessary to obtain good quality eggs from matured female eel. Ovulated eggs have been able to obtain easily by the progress of techniques for induction of maturation. However, egg quality, such as fertility and hatchability, is low and often fluctuated among females used. The present *in vitro* study shows that oocyte maturation and ovulation are induced by maturation-inducing steroid in shorter incubation period when larger oocytes are incubated at higher temperature.

In vivo experiments reveal that oocyte maturation and ovulation in female eels possessing larger oocytes are induced by hormonal treatments in shorter period and relatively good quality ovulated eggs are obtained from the female.

Key words: eel, induced maturation, oocyte diameter, temperature, egg quality

ウナギは飼育下では性的に未熟なままで産卵を行わないことや自然界で未だに成熟したウナギや産卵行動が観察されていないことなどから、繁殖生態や繁殖生理学の分野において非常に謎の多い魚である（香川、2001）。これまでの調査から、天然の雌ウナギは10月～12月にかけて成熟を開始するものの卵母細胞は卵黄形成初期までにしか達せず、雄では精子形成はほとんど開始しないまま降河し、それぞれ産卵場に向かうと考えられている**。一方、養殖ウナギでも性的に未熟なままであるが、海水飼育することによって天然ウナギ同様、雌ウナギが卵黄形成初期に達することが判明した（Kagawa *et al.* 1998, Fig. 1）。しかし、天然および養殖の雌ウナギの飼育を継続しても、それ以上に性成熟が進行することはない。従って、ウナギの種苗生産を行うためには人為的に受精可能な卵子や精子を得る必要がある。これまで養殖用の種苗生産技術の開発において、性的に未熟な状態の魚から受精卵を得よ

うとする試みは、技術的な難しさと煩わしさからウナギ以外にほとんど行われていないのが現状で、その技術開発は長く困難な道のりであった。

ウナギの人為的な成熟誘起技術の開発は1960年代から行われ、1970年代には北海道大学で、サケ脳下垂体抽出液を連続注射して成熟した雌ウナギから、世界で初めて受精卵やふ化仔魚が得られた（Yamamoto and Yamauchi, 1974）。その後、いくつかの県の水産試験場や大学などで同様の試みがなされ、一様に受精卵やふ化仔魚が得られるようになった。しかし、一方で、サケ脳下垂体抽出液を連続注射することにより、ほとんどの雌ウナギが卵黄形成を開始し卵径を増大させるものの、最終的に受精可能な卵子を得る確立は非常に低く、また、いつ受精可能な卵子が得られるかは雌ウナギ任せで、計画的に受精卵を生産することはできなかった。したがって、ふ化仔魚の飼育技術を開発しウナギの種苗生産技術を確立するためには、計画的に効

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

* 宮崎大学農学部 〒889-2192 宮崎県宮崎市学園木花台西1丁目1番地 (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, Miyazaki 889-2192, Japan)

**平成15年度ウナギ資源増大対策委託事業報告書, 日本水産資源保護協会

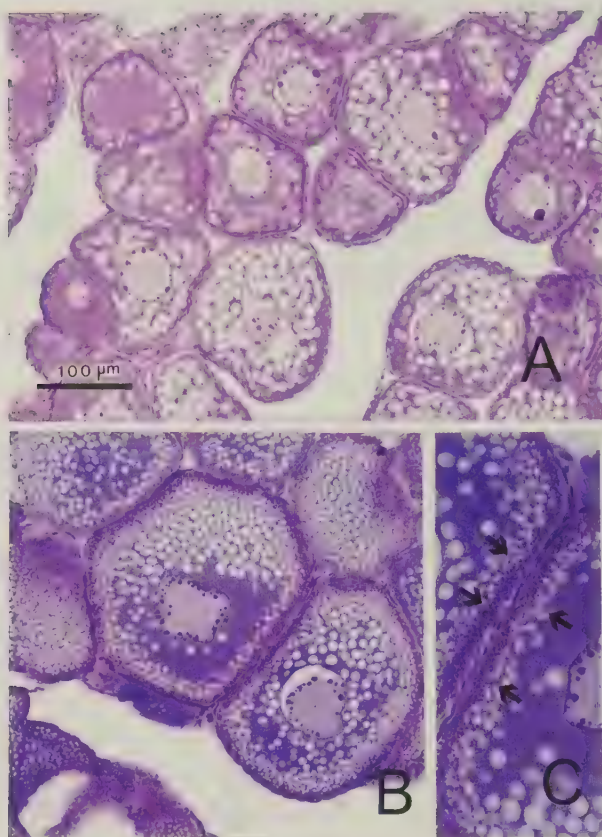


Fig. 1. Microphotographs of oocytes of female Japanese eel.

A: Oocytes at the oil stage observed in eel just prior to seawater acclimation, B: Oocytes at the primary yolk globule stage observed in eel 3 months after seawater acclimation. Yolk granules are observed in the periphery of the oocytes (C). (Modified from Kagawa *et al.*, 1998).

率よく受精卵を得るためのさらなる人為成熟誘導技術の開発が必要と考えられた。そこで、我々はサケ脳下垂体抽出液と卵成熟誘起ステロイドを用いて成熟を誘起する方法を開発することを目的に研究を行った。これまで通り、サケ脳下垂体抽出液を毎週1回注射して卵黄形成を誘導した。その後、卵黄形成を終了したと思われる雌ウナギ（卵径750 μm 程度の卵径を有する雌ウナギ）に、再度サケ脳下垂体抽出液を注射した24時間後にウナギの卵成熟誘起ステロイドである17, 20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン(DHP)を注射し、注射後18時間を中心に、ほぼ100%の成熟・排卵を誘導できることを明らかにした（香川, 1996; Ohta *et al.*, 1996）。この結果から、これまでの雌ウナギ任せであった成熟・排卵を計画的に誘導し、確実に受精可能な卵子を得ることが可能になった。しかし、この成熟誘導技術で得られた受精卵の受精率およびふ化率は低いこと、さらに用いる雌ウナギ

により、まったくふ化しないものから90%以上のふ化率を有するものまで非常に変動が大きく、計画的で効率的に受精卵を得るためにはさらなる技術の開発が必要であると考えられた。

一方、ウナギの繁殖生態に関する研究は知見が少ないことから、これまで人為成熟誘導技術を開発する上でウナギの成熟や産卵に及ぼす環境因子、特に水温の影響についてはあまり考慮されていない。魚類の成熟には水温や日長が重要な役割を果たしていることは明らかであり、ウナギでもこれらの環境因子が成熟の誘導や産卵に重要な役割を果たしていることは容易に想像がつく。そこで、本研究では効率的で計画的に良質な受精卵を得ることやウナギの繁殖生態、特に繁殖に及ぼす水温の影響を明らかにすることを目的に、人為的な成熟誘起に及ぼす水温や卵母細胞の卵径の影響について検討した。

人為成熟誘導に及ぼす水温の影響

河川に生息するウナギは10月ころから卵黄形成を開始し、12月ころには最も成熟が進んだ個体では第二次卵黄球期卵母細胞を有することが明らかにされている (Table 1)**。このころの河川水の水温は9月上旬から10月下旬にかけて30℃から20℃にまで急激に低下し、12月には15℃まで低下する。また、日長は9月下旬の秋分から12月下旬の冬至まで徐々に短日化する。また、最近の研究では、三河湾で10～12月にかけて卵黄形成中の雌ウナギが出現することや12月の海水温は15℃程度であることが報告されている (Uto *et al.*, 2004)。このようなことから、水温低下や短日化がウナギの性成熟開始の引き金を引くことによって卵黄形成が誘導されて成熟が進行し、そのまま海へ下ることが予想される。これまでの、雌ウナギの人為的な成熟誘導時の飼育水温はどの研究を見ても、20℃の一定水温で行われており、成熟誘導時の水温について詳細な研究はなされていない。天然の雌ウナギが上述したような環境下で成熟を開始し成熟が進行することを考えると、人為的な成熟誘導時にも天然と同じような環境下で成熟誘導することにより、良質卵を得ることができるのではないかと思われた。そこで、まず人為的な成熟誘導に及ぼす水温の影響について検討した。

卵黄形成への影響： 養殖雌ウナギ（平均体重約 800 g）を水温の異なる以下の水槽 4 群に分け、毎週 1 回、月曜日にサケ脳下垂体抽出液(20mg/尾)を注射した。処理群は①水温 15℃一定で飼育（15，15）。②水温 20℃で 4 週間飼育し、その後 15℃で飼育（20，15）。③水温 20℃一定で飼育（20，20）。④水温 15℃で 4 週

間飼育し、その後 20℃で飼育（15，20）である。その結果、卵黄形成が終了して成熟誘起が可能となる卵径 800 μm に達するまでの注射回数は水温が高いほど（20℃一定で飼育した群）少なく、水温が低いほど（15℃一定で飼育した群）多くなった。このことから、水温が低下すると卵黄形成の進行は遅くなることが判明した。これまでの研究から、天然のウナギの産卵期は6月から8月であると推測されており（塚本，2001），それが事実だとすると、上述したようにウナギは12月に降河し半年以上もかけて産卵場に達することになる。12月に降河したウナギの卵母細胞が第二次卵黄球期に達していることを考えると、これ以降の卵母細胞の発達は非常にゆっくり進行するものと考えられる。このことと本実験の結果を考え合わせると、降河したウナギは水温の比較的低い深海を移動して産卵場に向かうことが推定される。

卵成熟・排卵への影響： 卵黄形成を終了して、卵径が 800 μm を越えた個体に、サケ脳下垂体抽出液（20mg /尾）を午後 6 時に注射し、24 時間後に卵成熟誘起ステロイド（DHP）を 2 μg/g・体重になるように 50% エタノールに溶解して注射し、水槽の水温を 20℃に設定した。DHP 注射後15時間目と18時間目に腹部を圧迫して排卵の有無を確認し、排卵個体から卵を搾出し人工授精をして、受精率・ふ化率を求めた。その結果、天然の水温変化を模倣した20℃：15℃飼育群の受精率やふ化率が最も高く、平均でそれぞれ約70%および約40%に達し、20℃一定水温で飼育したこれまでの方法と比較して非常に高い値となった (Fig. 2)。このことから、卵質の良い卵を得るためには、このような飼育水温で飼育することが望ましいものと思われた。

Table 1. Sexual maturation of wild japanese eel and environmental factors

	Sep	Oct	Nov	Dec
WT	30℃～25℃	25℃～20℃	20℃～15℃	15℃～10℃
PP	Autumn equinox	<short photoperiod>		winter solstice
♀	Develop- mental stage	Oil stage	PYG	SYG
	GSI	1 <	1 – 2	2 – 5
♂	Develop- mental stage	Spermatogonia	Spermatocyte	
	GSI	1 <		

WT:water temperature, PP:photoperiod, PYG:primary yolk globule stage
SYG:secondary yolk globule stage

** 平成15年度ウナギ資源増大対策委託事業報告書，日本水産資源保護協会

成熟・排卵誘導時の卵径の影響：しかし、一方で、サケ脳下垂体抽出液注射時やDHP注射時の卵径を測定すると、各処理群間でそれぞれ異なっており、必ずしも同じ条件で成熟・排卵処理を行っていないことが判明した。このことから、上述したような飼育水温の影響で受精率・ふ化率に差が出たのではなく、むしろ、このような成熟・排卵処理時の卵径の違いが排卵された卵の卵質の違いに関与している可能性が考えられた。すなわち、最も受精率・ふ化率の良かった15℃：20℃飼育群のサケ脳下垂体抽出液注射時は約860 μm 、DHP注射時は約920 μm であったのに対し、その他の群は15℃：15℃飼育群以外はDHP処理時に900 μm 以下であった。15℃：15℃飼育群はサケ脳下垂体抽出液注射時ですでに卵径約890 μm に達していた。このような卵径や卵径増加の経緯が異なることが卵質に影響したのではないかと考えられた。さらに、これらの飼育群に同じ成熟・排卵誘起処理を行った結果、受精率・ふ化率が最も高かった20℃：15℃飼育群では、ほとんどの個体がDHP処理後15時間目で排卵しており他の処理群と比べて非常に高い割合であることが判明した。以前の我々の報告 (Ohta *et al.*, 1996) でも、DHP処理後から排卵までの時間が短い個体が受精率・ふ化率が良いという結果が得られており、今回の結果もそのことを裏づける結果となった。このことから、卵質の良い卵を得るためには、DHP処理から排卵までの時間を短くすることが重要であること、それには、これまで基準として使用されてきたサケ脳下垂体抽出液注射時の卵径750 μm 、DHP注射時の卵径850 μm という

卵径の卵母細胞よりも大きな卵径の卵母細胞を有する個体に成熟・排卵処理を行うことにより、排卵までの時間が短くなり、受精率・ふ化率が高くなるものと考えられた。そこで、この仮説を証明するために以下のような生体外培養法を用いた実験を行った。

生体外培養法を用いた成熟・排卵

卵径と成熟・排卵までの時間の関係：実際に卵径と成熟や排卵までの時間がどのような関係になっているのだろうか。このことを明らかにする目的で、生体外培養法を用いて研究を行った。養殖雌ウナギ（平均体重約800 g）にサケ脳下垂体抽出液を毎週1回、20mg/尾投与し卵黄形成を誘導した個体からカニューラにより卵濾胞付き卵母細胞を生体外に採りだし実験に供した。実体顕微鏡下で単離した卵径800 μm から960 μm の卵濾胞付き卵母細胞20～30個をDHPを含むL-15培養液1 mL中で20℃で培養し、3時間おきに24時間目まで卵成熟 (GVBD) および排卵した卵の割合を求めた。その結果、DHPにより生体外で成熟と排卵が誘導され、その排卵には内因性のプロスタグランジンが関与していることが明らかとなった (Kagawa *et al.*, 2003)。また、DHPによるGVBDおよび排卵の時刻は培養開始時の卵径に依存し、卵径が大きいものほど早くGVBDおよび排卵が誘起された。これら生体外培養法を用いた実験結果から、生体内でもDHP処理により同様の現象が起きていることが推察され、卵径が大きい個体ほど成熟・排卵が早くなるものと考えられた。

成熟・排卵に及ぼす水温の影響：これまでの生体内及び生体外の実験結果から、DHPで誘導されるウナギの卵成熟や排卵は、DHP処理を行う時点の卵径が大きいものほど早く起こることや、DHP処理から排卵までの時間が短いほど受精率・ふ化率のよい卵を得ることができることが明らかとなった。一方、これまでの実験から飼育水温が高いほど卵黄形成が促進され、低いほど卵黄形成が遅くなった。従って、飼育水温は、卵黄形成ばかりではなく、卵成熟・排卵までの時間にも影響を及ぼす可能性が考えられることから、水温が成熟・排卵に及ぼす影響について検討した。卵径850～880 μm の濾胞付き卵母細胞20～30個をDHP100ng/mLを含むL-15培養液中で培養温度15、20、25、30℃で培養し、培養後15時間目にGVBDと排卵の割合を求めた (Fig. 3)。その結果、GVBDは水温20℃および25℃では15時間目にほぼ完了していたが、15℃ではわずしか誘起されず、30℃では誘起されなかった。排卵は培養温度20℃、25℃および30℃ではほぼ完了していたが、15℃では排卵は認められなかった。このことから、卵

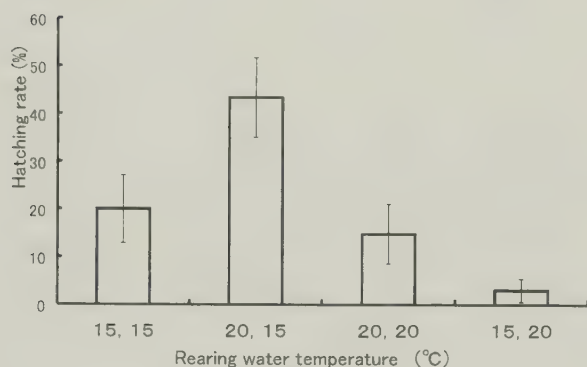


Fig. 2. Effects of rearing water temperature of female Japanese eels on hatching rates of fertilized eggs. 15,15: Fish were reared at constant water temperature (15℃). 20,15: Fish were reared at 15℃ after rearing at 20℃ for four weeks. 20,20: Fish were reared at constant water temperature (20℃). 15,20: Fish were reared at 20℃ after rearing at 15℃ for four weeks.

成熟・排卵の適水温は20～25℃であると判断された。また、排卵は卵成熟が誘導されなかった30℃でも誘導されたが、卵成熟が誘導された15℃ではまったく誘導されなかった。このことから、排卵の適水温は成熟の適水温よりも高い20℃から30℃までの間に存在する可能性も考えられた。これまで、自然界でウナギの産卵を観察した報告は全くなく、ウナギがどのような水温の海域で産卵しているかは不明である。本研究の結果から、15℃では卵成熟や排卵誘導は著しく阻害されることから、このような低水温海域では産卵をしていない可能性がある。受精卵のふ化に及ぼす影響を調べた結果、19℃ではほとんどふ化が起これなかったこと（飯沼ら、未発表）からも産卵やふ化は20℃以上の水温の海域で行われていることが示唆される。また、卵成熟よりも排卵の適水温の方が高い可能性が考えられたことから、比較的水温の低い（20℃～25℃）海域で成熟が進行し、さらに高い温度（25～30℃）の水域で排卵・産卵することも考えられる。

これまでの生体内や生体外の実験結果を総合すると、ウナギは20～15℃になると卵黄形成を開始するものの、降河後は15℃以下（水深約700～800m以深）の水温海域を産卵場に向かい、ゆっくりと卵黄形成が進行する。産卵場では比較的低い温度（20℃～25℃、水深約100～200m）で卵成熟を起こし、産卵はさらに25℃～30℃（水深約100m以浅）で行われている可能性が考えられる。そこで、人為的な卵成熟・排卵誘導時にもこのような温度で飼育したときに卵質がどのような影響を受けるのかについて検討した。

卵成熟・排卵時の飼育水温が受精率・ふ化率に与える影響：このことを確かめるために、サケ脳下垂体抽出液の注射により卵径850～900 μm に達しDHPを注射し

た雌ウナギを2群に分け、1群は水温20℃一定で飼育し、もう1群はDHP注射後6時間目に水温を20℃から25℃に上げて飼育した。DHP注射後、12、14、16時間目に腹部を圧迫して排卵の有無を確認し、排卵個体から卵を搾出し人工授精をして、受精率・ふ化率を求めた。その結果、最終成熟誘起時の飼育水温を20℃に保った群では14～16時間目に排卵したが、DHP投与後6時間目に25℃に上げた群では12～14時間目に排卵し、生体外培養の結果と同様に水温を上昇させることによって排卵時刻を早めることができることが判明した。しかし、20℃から25℃で飼育した個体の平均受精率および孵化率は20℃のそれらと比較し低くなった。この結果は、排卵までの時間が早いほど受精率・ふ化率が高くなることと矛盾する。おそらく、25℃で排卵を誘導された個体の卵質は飼育水温が高いために排卵後の時間経過とともに急激に卵質が低下したのではないかと推察される。今後、このようなことが実際に起こる可能性があるのかどうかについて、排卵された卵の卵質に及ぼす水温の影響について検討が必要である。

おわりに

本研究の結果、卵黄形成から成熟・排卵誘導までの飼育水温や成熟・排卵時の卵径を調節することにより、排卵までの時間が早まり、卵質が改善されることが判明した（Kagawa, 2003）。新たに改良された雌ウナギの成熟誘起方法はFig. 4に示すとおりである。水温20℃から15℃で飼育しサケ脳下垂体注射により卵母細胞の卵径が約850 μm に達した雌ウナギに再度サケ脳下垂体を注射し、24時間後に卵径が約900 μm 以上に達した個体にDHPを注射することにより、受精率50%、ふ化

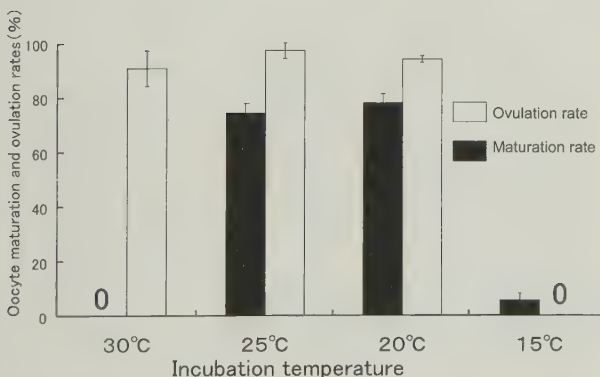


Fig. 3. Effects of temperature on *in vitro* oocyte maturation and ovulation in Japanese eel

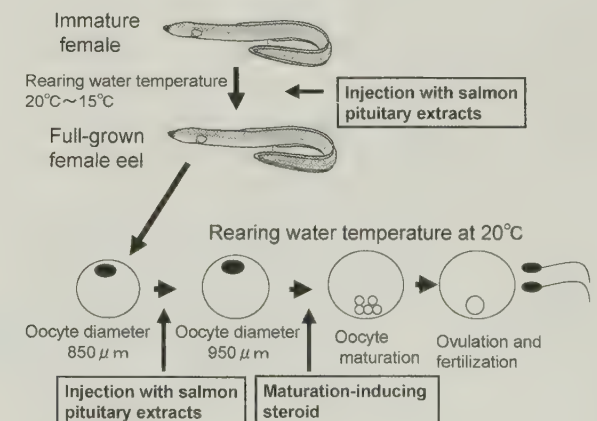


Fig. 4. Improved methods for induced maturation of female Japanese eel

率40%程度の卵質の卵が得られるようになった。しかし、個体間のばらつきは存在し、今後効率的で安定した種苗生産を行うためには、卵質の個体間のばらつきの原因を明らかにし、それをなくす対策を立てることが重要であると考えられる。

文 献

- 香川浩彦, 1996: 雌の成熟促進技術, 「ウナギの初期生活史と種苗生産の展望」(多部田修 編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.95-107.
- 香川浩彦, 2001: ウナギの繁殖生理学. 海洋と生物, **23**, 130-136.
- Kagawa H., 2003: Artificial induction of oocyte maturation and ovulation, in "Eel Biology" (ed. by Aida K., Tsukamoto K., and Yamauchi K.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.401-414.
- Kagawa H., Iinuma N., Tanaka H., Ohta H., and Okuzawa K., 1998: Effects of rearing period in seawater on induced maturation in female Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, **64**, 77-82.
- Kagawa H., Tanaka H., Unuma T., Ohta H., Gen K., and Okuzawa K., 2003: Role of prostaglandin in the control of ovulation in the Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, **69**, 234-241.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa H., and Hirose K., 1996: Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **139**, 291-301.
- 塚本勝巳, 2001: ウナギの産卵生態. 海洋と生物, **23**, 123-129.
- Uto T., Mikawa N., Okamura A., Yamada Y., Tanaka S., Horie N., Akazawa A., and Oka H. P., 2004: Ovarian morphology of the Japanese eel in Mikawa Bay. *J. Fish Biol.*, **64**, 502-513.
- Yamamoto K. and Yamauchi K., 1974: Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature*, **251**, 220-222.

ウナギ卵黄タンパクの生化学

— 分子動態と浮遊性調節への関与 —

松原孝博*・安藤 忠*・大久保信幸*・澤口小有美*

Biochemical characteristics of yolk proteins in Japanese eel - involvement of selective yolk proteolysis in modulation of egg buoyancy -

Takahiro MATSUBARA*, Tadashi ANDOH*, Nobuyuki OHKUBO*,
and Sayumi SAWAGUCHI*

Abstract Maturation-associated hydration via controlled proteolysis of yolk proteins is the main event in cytoplasmic maturation of oocytes in marine pelagic egg spawning teleost. Failure of such the event likely reflects low fertilizability of eggs and high mortality of embryos. To improve "egg quality" of Japanese eel, we tried to elucidate biochemical characteristics of yolk proteins and their molecular alterations during oocyte maturation. Three forms of vitellogenin (Vg) appear to exist in Japanese eel, including two types of complete Vg (Vg 1 and Vg 2) and phosvitinless Vg (PvIVg). These classes of yolk protein which are derived from the Vgs play distinct roles in regulation of oocyte hydration through selective proteolysis in oocytes undergoing oocyte maturation. The regulation system of oocyte hydration in Japanese eel is unique and completely different from those in teleost members of higher taxa, eg. Acanthopterygii. We discussed here the characteristics of yolk proteins and their possible roles in regulation of egg buoyancy, with respect to improvement of egg quality in the Japanese eel.

Key words: Japanese eel, vitellogenin, yolk protein, egg buoyancy, egg quality

ウナギは水槽内での飼育下で自発的に成熟・産卵が起らないことから、養殖用の種苗を生産するためには、現在行われているようなホルモン投与による人為的な催熟は避けて通れない。こうして催熟された雌から得られた卵は、受精率や孵化率が低かったり、あるいは孵化後の仔魚の生残に問題があったりする場合が多い。このような現象は「卵質が悪い」と表現されている。しかし、その原因を考えた場合、1) 卵に蓄積される栄養物質に関する問題、2) 卵黄形成や最終成熟に

関する問題、3) 排卵後の時間経過に関する問題（過熟）といった点があげられるが、実際に各々の場合に何が原因で受精、孵化、生残に影響を及ぼしているのかは明らかにされていない。我々はこの中から 2) に着目して、卵黄タンパクの性状と利用動態を調べることで卵質低下要因を探索する試みを行った。

一般に、硬骨魚類の卵内には卵黄タンパクと脂質が主要な栄養として蓄積されている。これらのうち卵黄タンパクは、卵巣で合成されるエストラジオール

17 β （雌性ホルモン）の作用によって、肝臓で前駆タンパクのビテロジェニン（Vg）として合成され、血液によって卵巣に運ばれて発達中の卵母細胞に取り込まれる。卵母細胞に取り込まれたVgは卵黄形成期を通じてカテプシンDによる限定的な分解を受けて卵黄タンパクとなり蓄積されていく。魚類の卵黄タンパクは脂質タンパクのリポビテリン（Lv），リンタンパクであるホスビチン（Pv）， β' 成分（ βc ）などからなることが知られている。近年の遺伝子解析から、棘鰭上目や側棘鰭上目に属するいわゆる高等な魚類であるマミチョグ *Fundulus heteroclitus*，マツカワ *Verasper moseri*，ハドク *Melanogrammus aeglefinus* などでは2種類のVg（VgA，VgB）をコードする遺伝子が見出されており、鳥類や両生類に続いて魚類も多型の

Vgをもつことが明らかになってきた（Matsubara *et al.*, 2003）。

魚類の卵の性質を見ると、生息する水の中で浮くもの（浮遊性卵）と沈むもの（沈性卵）に大別される。特に棘鰭上目，側棘鰭上目の海産魚には、マダイ，ヒラメ，クロマグロ，ブリ，スケトウダラをはじめ、浮遊性卵を生む種類が多数見られる。これらの卵の浮力は、主に卵内部に含まれる90%を超える水分によって生み出され、その水は最終成熟期に起こる劇的な「吸水」によって母体から取り込まれる。我々の先の研究から、マツカワではVgAとVgBに由来する卵黄タンパクを一定の比率で卵母細胞内に蓄積し、最終成熟期に異なる分解を経て、一定量の遊離アミノ酸を産生することが分かっている。これらの遊離アミノ酸は吸水の

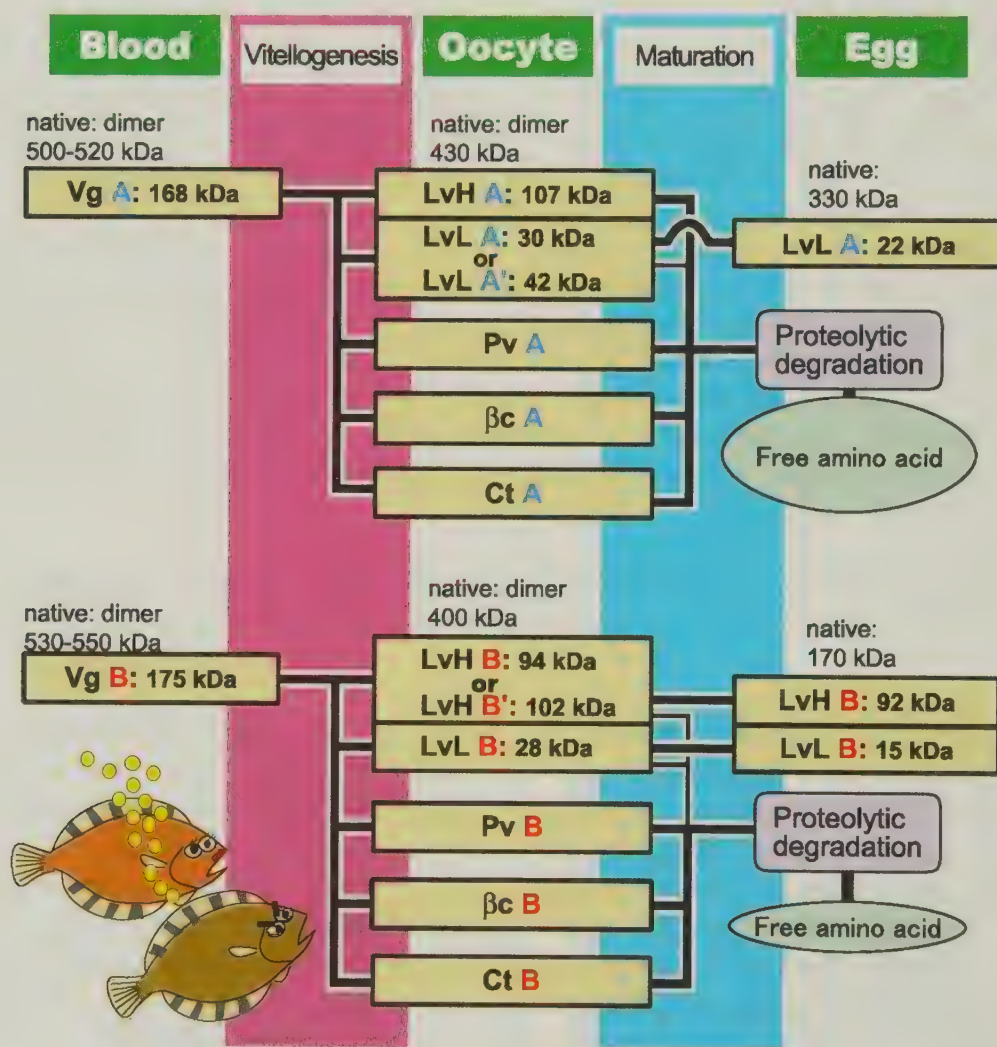


Fig. 1. Flowchart describing molecular alterations of vitellogenins and vitellogenin-derived yolk proteins during vitellogenesis and oocyte maturation in barfin flounder, *Verasper moseri* (modified from Matsubara *et al.*, 1999). Vg: vitellogenin, LvH: lipovitellin heavy-chain, LvL: lipovitellin light-chain, Pv: phosvitin, βc : β' -component, Ct: C-terminal component.

原動力として用いられ、Vg の多型を利用した巧妙な浮遊調節といえる (Fig. 1)。こうした浮遊性調節に関与するメカニズムには極めて複雑なプロセスを含んでおり、いずれかのプロセスの不調は直ちに卵質に影響すると考えられる。

多型Vgによる卵の浮遊性調節は、マダイ、スケトウダラ、ホワイチパーチでも認められ、魚に広く共通する。一方、より原始的な魚とされるカレイワシ上目のウナギも浮遊性卵を生むが、同様の浮遊性調節を行うか否かについては全く明らかにされていない。そこで、本研究では、ウナギの卵質を左右する要因を見出し、将来的に卵質の評価マーカーとするため、卵黄タンパクを生化学的、分子生物学的に調べると共に、最終成熟に伴ってそれらが分解され、浮力獲得に利用されているか否かを明らかにすることを目的とした。

ウナギの卵黄タンパクの種類と性状

これまでに、ウナギにおいても、少なくとも2種類のVg遺伝子が存在していることが明らかにされている。

これらのVg遺伝子はVg 1 (GenBank:AY423445) と Vg 2 (GenBank: AY423444) と名付けられており、Vg 1 遺伝子はシグナルペプチドを含む1734残基のアミノ酸をコードする。また、Vg 2 は5'末端が未決定であるものの、その配列は1759残基のアミノ酸をコードしている。それぞれの遺伝子から推定されたアミノ酸配列と、既知のVgA、VgBの遺伝子から推定されたアミノ酸との間で相同性を調べたところ、ウナギVg 1 と Vg 2 はカダヤシやマツカワなど高等な魚類に見られるVgA、VgBのいずれかに属するというような傾向は示さなかった。これまでに遺伝子解析が行われたマミチョグVgI (GenBank: U07055, LaFleur *et al.* 1995, VgAに相当) および Vg II (GenBank: U70826, LaFleur *et al.* 2005, VgBに相当)、ハドックVgAおよびVgB (GenBank: AY423445, AY423445, Reith *et al.*, 2001)、ニジマスVg (GenBank: X92804, Mouchel *et al.*, 1996) は、Vgタンパクの内部に将来卵黄タンパクとなるドメイン構造が見られ、その配置はN末端側からLv重鎖 (LvH)、Pv、Lv軽鎖 (LvL)、βc、C末端成分 (Ct) の順となっている (Hiramatsu

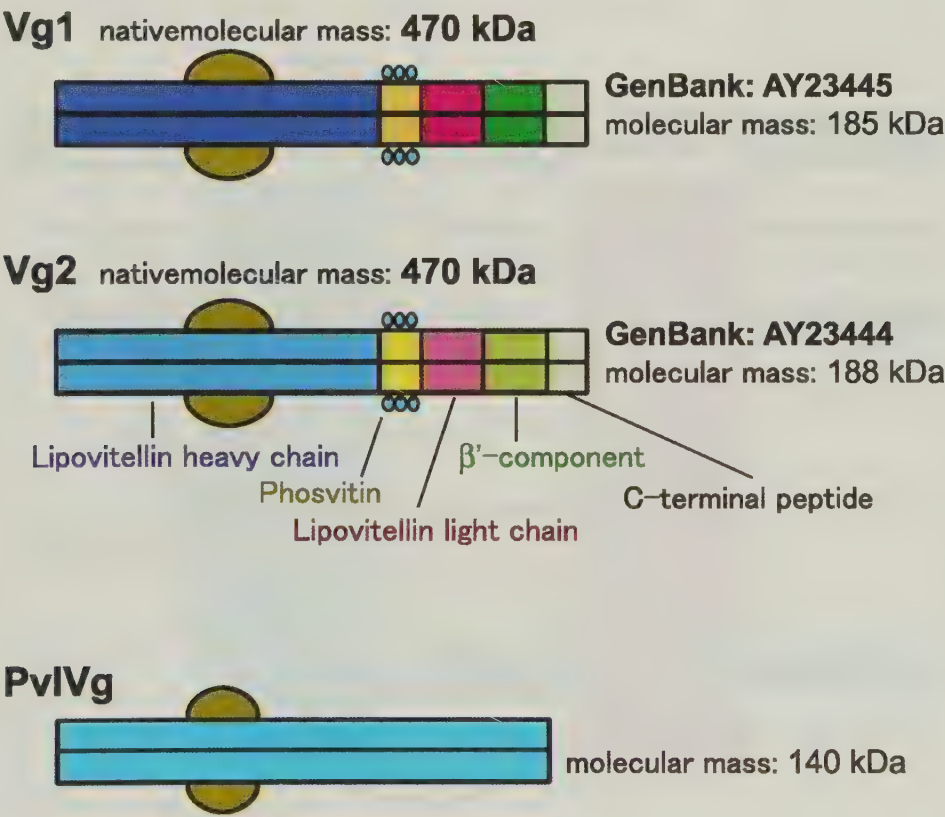


Fig. 2. Three forms of vitellogenin genes and their deduced protein structures in Japanese eel. Vg: vitellogenin, PvlVg: phosvitinless vitellogenin.

et al., 2002a; b)。ウナギのVg1, Vg2もこうした一般的な型のVgに属している (Fig. 2)。これらに対して、近年、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* でPv領域がなく, LvL- β c-Ctの部分極めて短い新規のVgが見出された (Wang *et al.*, 2000)。このVgはその特徴からPv欠損型Vg (PvlVg) と呼ばれている。PvlVgはその後マハゼ (Ohkubo *et al.*, 2003), カダヤシ (Sawaguchi *et al.*, 2005) で遺伝子とタンパク両側面からその存在が確かめられている。これら既知のPvlVg遺伝子の塩基配列から相同性の高い部分を選び、プローブを作製して、ウナギPvlVg遺伝子のクローニングを行ったところ、全長約4.7 kbpのcDNAが得られた (Fig. 2)。この遺伝子から推定されるVgタンパクはVg1, Vg2に比べて小さく、その内部には明瞭なPv領域を含んでいないことからウナギPvlVg遺伝子であると考えられた。これら3種の遺伝子産物であるVgタンパクが血中に放出され卵母細胞に取り込まれているか否か、生化学的分析を行った。人為催熟雌血清、卵黄形成期の卵母細胞および排卵卵抽出液のゲルろ過クロマトグラフィーによる分析から、血清中のVgの分子量は約470 kDaで、卵母細胞に取り込まれると主要な卵黄タンパクであるLvへと変化し、その分子量は低下する。また、ゲルろ過画分中のリンの測定および免

疫学的な検出からPv, β cが一部切除されることが示唆された。さらに最終成熟を経るとLvおよびPvの分子量はさらに小さくなることが示された。

主要な卵黄タンパク画分のSDS電気泳動と分離されたポリペプチドバンドのN末端および内部アミノ酸配列分析から、各卵黄タンパク構成ペプチドの分子量とVg遺伝子上でのポジションを明らかにした。また、LvHの内部シーケンスからVg1, Vg2 遺伝子より作られた2種類のVgがいずれも含まれていることが示唆された。しかしながら、遺伝子が見つかったPvlVgはゲルろ過においても主要なピークを形成せず、またSDS電気泳動分析からもそれに相当すると思われる明瞭なバンドは見つかっておらず、Vg1およびVg2タンパクと比較して卵母細胞に蓄積されている量が極めて少ないと考えられる。現在、その量的な比率を明らかにするため、PvlVg由来の卵黄タンパクを精製して抗血清を作製し、免疫学的な分析を進めている。

卵黄タンパクの役割と卵質への影響

最終成熟を経て、受精可能な卵になる際に、それぞれの卵黄タンパクはどのように分解され、卵の浮遊性を獲得しているか調べるため、排卵された卵内に含まれ

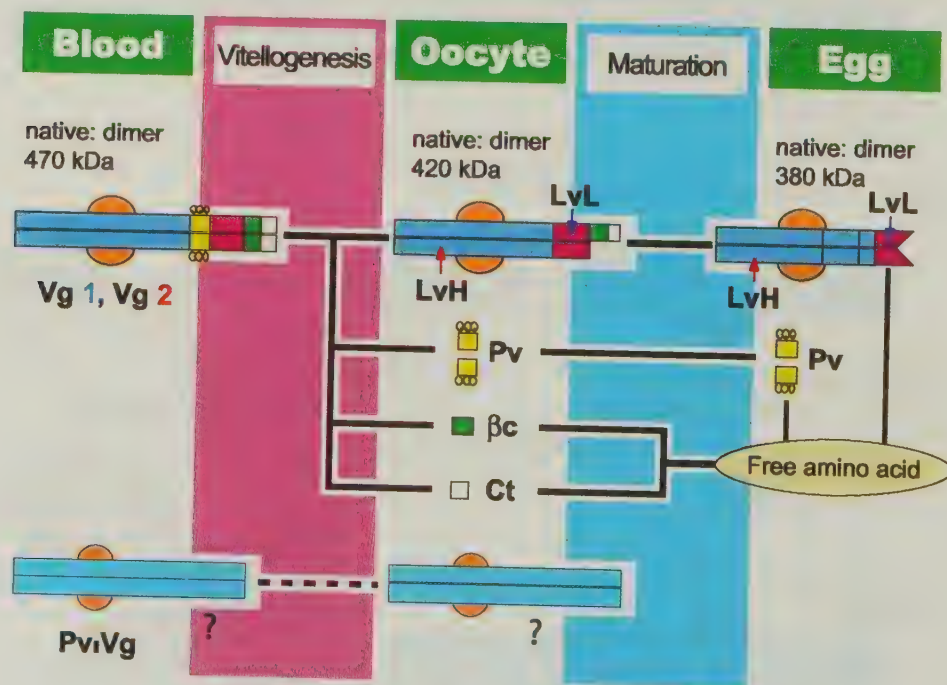


Fig. 3. Flowchart describing molecular alterations of vitellogenins and vitellogenin-derived yolk proteins during vitellogenesis and oocyte maturation in Japanese eel. Abbreviations are same as Figure 1 and 2.

る卵黄タンパクを生化学的に分析し、その結果をFig. 3に取りまとめた。ウナギの場合も既知のマツカワ (Matsubara *et al.*, 1999) やホワイトパーチ (Hiramatsu *et al.*, 2002a) といった浮遊性卵を生む魚種と同じく最終成熟期に卵黄タンパクの分解が引き起こされる。しかしながら、マツカワなどの場合は、VgAとVgBに由来する卵黄タンパクを巧みに分解し分けることで卵の吸水量を決定して浮力を調節しているが、ウナギの場合はそれとは大きく異なっていることが明らかになってきた。マツカワやスケトウダラなどの卵では、吸水のための浸透圧上昇因子としてVgA由来の卵黄タンパクの大部分をアミノ酸まで分解し、一方で胚発生後半の栄養源としてVgB由来の卵黄タンパクを温存する。これに対してウナギではVg1とVg2に由来する卵黄タンパクの間で分解され方に大きな違いは見られず、いずれもLvLとPvの一部分および βc が分解の対象となっていると考えられる (Fig. 3)。このモデルから分解産物の遊離アミノ酸量を予想した場合、実際の測定結果とよく一致する。このことから、ウナギでも最終成熟の際に卵黄タンパクを分解し、遊離アミノ酸の増加による浸透圧の上昇を利用して吸水の駆動力の一部としているが、2種類のVgを遊離アミノ酸

量の調節に用いない点が本種の特徴といえる。このことは、ウナギで用いられている卵の浮遊性調節システムが、高等な魚で広く用いられているVgA, VgBによる「Dual-Vg system」の原型を留めたものである可能性を強くうかがわせる。

マツカワの卵母細胞の最終成熟期には、1) 卵黄タンパク分解酵素の活性化に必要な卵母細胞内の酸性化、2) カテプシンBなどのタンパク分解酵素による卵黄タンパクの遊離アミノ酸への分解、3) 遊離アミノ酸を浸透圧上昇因子とする卵母細胞内への吸水、4) 吸水によって変化したイオンバランスの調整、5) 卵母細胞内の容積増大に伴う卵黄球の融合、6) 卵母細胞内の中性化とタンパク分解酵素の不活性化といった、「核の最終成熟」と同期して起こる「細胞質の最終成熟」にかかわるきわめて複雑な現象が見られる (Fig. 4)。ウナギにおいても、本研究で最終成熟期に卵黄タンパクが分解し、遊離アミノ酸が増加することが確認されたことから、卵母細胞内では類似の細胞質の最終成熟が起こっているものと考えられる。このプロセスのそれぞれには、数多くの遺伝子や、それらの産物であるタンパクが働いている。従って、それらの中のいずれかがうまく機能しなければ、あるいは機能するタイミングが狂えば

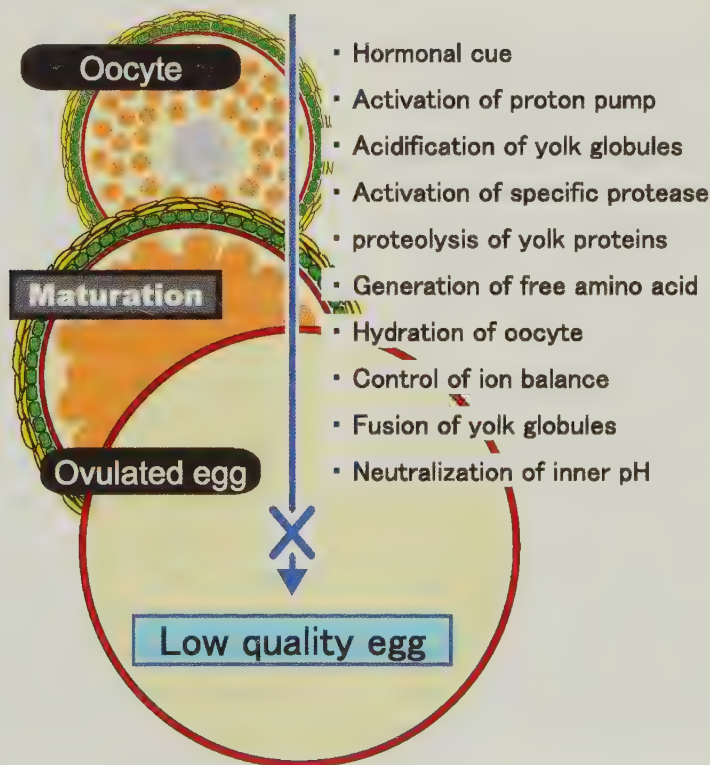


Fig. 4. Possible degradation mechanism of egg quality caused by incomplete cytoplasmic maturation of oocytes

卵の質は低下することになる。ウナギで行われている現行のホルモンによる人為的な催熟では、自発的な成熟・排卵の場合と異なり、ホルモン投与のタイミングは高度の経験によって、個体毎の状況を見ながら推し量られている。今後そうした操作の手助けとなる、卵質低下を防ぐ技術の研究開発が急務となろう。

おわりに

本研究から、ウナギの卵に含まれている卵黄タンパクの性状と、卵が機能を果たす上でそれらがどのような役割を担っているのかが明らかになってきた。最終成熟期に起こる卵黄タンパクの分解を制御するメカニズムについては現在研究を進めており、そうしたメカニズムの失調と卵質低下との関連もやがて明らかに出来ると考えている。ここでは卵黄タンパクに焦点を当てて卵質の問題に取り組んできたが、卵質を低下させる要因には、卵内外を含めてまだ多くの事柄が候補として考えられる。今後、それらの検討を含めて良質卵獲得技術の確立に資する研究に発展させていく必要がある。

文 献

- Hiramatsu N., Matsubara T., Hara A., Donato D. M., Hiramatsu K., Denslow N. D., and Sullivan C. V., 2002a: Identification, purification and classification of multiple forms of vitellogenin from white perch (*Morone americana*). *Fish Physiol. Biochem.*, **26**, 355-370.
- Hiramatsu N., Matsubara T., Weber G. M., Sullivan C. V., and Hara A., 2002b: Vitellogenesis in aquatic animals. *Fish. Sci.*, **68**, 694-699.
- LaFleur G. J. Jr., Byrne B. M., Kanungo J., Nelson L., Greenberg R. M., and Wallace R. A., 1995: *Fundulus heteroclitus* vitellogenin: The deduced primary structure of a piscine precursor to noncrystalline, liquid-phase yolk protein. *J. Mol. Evol.*, **41**, 505-521.
- LaFleur G. J. Jr., Gary J., Raldua D., Fabra M., Carnevali O., Denslow N., Wallace R. A., and Cerda J., 2005: Derivation of major yolk proteins from parental vitellogenins and alternative processing during oocyte maturation in *Fundulus heteroclitus*. *Biol. Reprod.*, in press.
- Matsubara T., Nagae M., Ohkubo N., Andoh T., Sawaguchi S., Hiramatsu N., Sullivan C. V., and Hara A., 2003: Multiple vitellogenins and their unique roles in marine teleosts. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 295-299.
- Matsubara T., Ohkubo N., Andoh T., Sullivan C. V., and Hara A., 1999: Two form of vitellogenin, yielding two distinct lipovitellins, play different roles during oocyte maturation and early development of barfin flounder, *Verasper moseri*, a marine teleost that spawns pelagic eggs. *Dev. Biol.*, **213**, 18-32.
- Mouchel N., Trichet V., Betz A., Le Pennec J. P., and Wolff J., 1996: Characterization of vitellogenin from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gene*, **174**, 59-64.
- Ohkubo N., Mochida K., Adachi S., Hara A., Hotta K., Nakamura Y., and Matsubara T., 2003: Development of enzyme-linked immunosorbent assays for two forms of vitellogenin in Japanese common goby (*Acanthogobius flavimanus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **131**, 353-364.
- Reith M., Munholland J., Kelly J., Finn R. N., and Fyhn H. J., 2001: Lipovitellins derived from two forms of vitellogenin are differentially processed during oocyte maturation in haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). *J. Exp. Zool.*, **291**, 58-67.
- Sawaguchi S., Koya Y., Yoshizaki N., Ohkubo N., Andoh T., Hiramatsu N., Sullivan C. V., Hara A., and Matsubara T., 2005: Multiple vitellogenins (Vgs) in mosquitofish (*Gambusia affinis*): Identification and characterization of three functional Vg genes and their circulating and yolk protein products. *Biol. Reprod.*, **72**, 1045-1060.
- Wang H., Yan T., Tan J. T. T., and Gong Z., 2000: A zebrafish vitellogenin gene (vg3) encodes a novel vitellogenin without a phosvitin domain and may represent a primitive vertebrate vitellogenin gene. *Gene*, **256**, 303-310.

個別飼育法によるニホンウナギの卵質判定

鵜沼辰哉*・野村和晴*

Evaluation of egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, by individual rearing method

Tatsuya UNUMA*, Kazuharu NOMURA*

Abstract To improve the quality of eel eggs, it is essential to determine correctly the parameters associated with egg quality such as the rates of fertilization, hatching and survival. The method for assessing these parameters needs to be easy and stable. We found that eel larvae hatched in small wells of tissue-culture microplates (one larva in one well) survived beyond the completion of yolk absorption without the need of removing dead larvae, changing the water or feeding. Using this individual rearing method, rates of fertilization, hatching and survival can be determined successively in the same individuals with minimum management.

Key words: eel, egg quality, hatching, survival, microplate

魚類の種苗生産にとって、質の良い卵を得ることはたいへん重要である。とくに、人為催熟で得られるウナギ卵の卵質は不安定であるため、種苗生産の実用化には、卵質を的確に判定したうえでその改善を図ることが必須である。一般に卵質は受精、ふ化のみならず、ふ化仔魚の生残にも影響を及ぼす。とくに摂餌開始までは必要な栄養を卵に依存するので、卵質の影響は大きい。これに対し、摂餌開始後には摂取する餌料の影響が大きくなるため、卵質の影響は相対的に小さくなると考えられる。このことから、我々は受精・ふ化成績に加えて摂餌開始期までの生残成績を卵質判定の重要項目ととらえ、「一定数の卵を人工受精したとき、摂餌開始ステージまで育つ仔魚の割合をできるだけ高めること」を卵質改善の目標と考えている。

ウナギの種苗生産に関する研究においては、これまで卵質判定には受精率とふ化率のみが用いられてきた(Ohta *et al.*, 1996など)。受精率・ふ化率が比較的容易に測定できるのに対し、ふ化仔魚の生残率を簡便に測定できる方法が確立されていなかったことが主な理

由であろう。そこで我々は、栽培プロ研第1期課題「ウナギの卵質評価手法の確立と改善技術に関する研究」(課題担当、鵜沼辰哉・野村和晴・古板博文・山本剛史：研究協力、近畿大学農学部 太田博巳)において、できるだけ労力をかけずに安定して受精率・ふ化率・生残率を測定する方法の開発に取り組んだ(Unuma *et al.*, 2004)。

ビーカーでの生残率測定

一般にマダイやヒラメ等の海産魚の初期生残率を測定するには、ビーカー、シャーレ、組織培養用マイクロプレート(6穴、12穴などウェルの大きなもの)などの容器に数十～数百尾のふ化仔魚を収容し、毎日1、2回死亡魚を除去して数える方法が用いられている。この方法では、水質を維持するためにもこまめに死亡魚を取り除く作業が欠かせない。我々もまずこの方法をウナギで試みたものの、①収容直後の死亡がしばしば認められる、②毎日2回死亡魚を除去しないと生残

が安定しない, ③ふ化から摂餌開始期までマダイやヒラメの2倍の8日間を要するために労力がかかる, といった問題点が明らかになった。①および②の原因としては, ①仔魚が収容時のハンドリングに対して敏感であること, ②死亡魚が他の仔魚に及ぼす影響が大きいことなどが考えられた。したがって, ①ふ化前から②1尾ずつ隔離して飼育すれば, これらの問題点を解決できるのではないかと予想された。そこで, マイクロプレートのウェルに受精卵を1個ずつ収容してふ化させ, 摂餌開始期まで飼育する方法を試すことにした。

マイクロプレートでの個別飼育

まず, マイクロプレートのウェル数(飼育水の容量)が仔魚の生残に及ぼす影響を調べるために, 24穴, 48穴および96穴の3サイズのマイクロプレートにおける生残経過を比較した。ペニシリンGカリウム塩(100,000IU/L)およびストレプトマイシン硫酸塩(0.1g/L)を添加したろ過海水を24穴(4枚), 48穴(2枚)および96穴(1枚)プレートの各ウェルに2, 1および0.25mLずつ分注し, 受精8時間後(胞胚期)の卵を1個ずつ収容した。22°Cの湿箱に保管し, ふ化後も飼育水の交換と死亡魚の除去を行わず, 全滅するまで毎日実体顕微鏡下で生残を観察した(Fig. 1)。ふ化翌日までに多数の仔魚が死亡したものの, その後の生残は少なくともふ化8日後(摂餌開始期)まではどのプレートでも良好であった。ふ化9日後を過ぎるとウェル数の多い(飼育水の少ない)プレートから死亡が増え始め, 19日後までに全個体が死亡した。飼育水が少ないほど早く全滅したことから, 餓死のみならず水質

の悪化も死因になっていると考えられた。これらの結果から, マイクロプレートのウェル中で卵から摂餌開始期まで, 換水も死亡魚の除去も行わずに飼育することが可能であることが明らかとなった。プレートサイズは96穴では摂餌開始期の直後から死亡が多くなることと, 24穴では1枚のプレートに収容できる尾数が少ないことから, 48穴が最も実用的と考えられたので, 以後の実験には48穴プレートを用いることにした。

ふ化直後の浮上斃死

ふ化翌日までに多数が死亡する原因を明らかにするため, ウェル内でのふ化前後の様子を実体顕微鏡下で観察した。卵は水面に浮かんでいるため, ふ化も水面で起こる。ふ化直後に速やかに水面から離れて潜ることができた仔魚はそのまま生き延びたが, 水面に張り付いて逃れられなくなり数十分以内に死亡する仔魚もしばしば観察された。キジハタ(Yamaoka *et al.*, 2000)やハガツオ(Kaji *et al.*, 2003)では, 摂餌開始期の仔魚が水面に張り付いて死ぬ現象が知られ, 浮上斃死と呼ばれている。ウナギのふ化直後の斃死も, ステージこそ異なるものの浮上斃死に相当すると考えられた。この現象は水の表面張力を弱める物質, 例えば卵白, ウシ血清アルブミン, ポリエチレングリコールなどを飼育水に添加することにより防ぐことが可能である(Kaji *et al.*, 2003; Tagawa *et al.*, 2004)。そこで, 飼育水にポリエチレングリコールを添加してふ化直後の浮上斃死を防除できるか否かを検討した。

抗生物質を含むろ過海水にポリエチレングリコール6000(分子量約7000)を0, 1, 10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で溶解し, 48穴プレートの各ウェルに1mLずつ分注した。受精後の卵を1粒ずつ収容し, ふ化率およびその後の生残率を比較した(Fig. 2)。ふ化率はどの濃度でも同程度であった(Fig. 2-A)。ふ化数を100としたときのふ化1日後の生残率は0 $\mu\text{g/mL}$ 区では浮上斃死のため40%に低下したが, 1および10 $\mu\text{g/mL}$ 区では斃死はほとんど起こらなかった(Fig. 2-B)。ふ化1日後まで生き残った仔魚の数を100としたときのその後の生残経過は, どの濃度でも差はなかった(Fig. 2-C)。これらの結果から, ポリエチレングリコールの添加はふ化率や生残率に影響を及ぼすことなく, 浮上斃死を防ぐのに有効であることが明らかとなった。なお, その後の研究で, ウシ血清アルブミンの添加によってもほぼ同様の効果が確かめられている(養殖研 鵜沼ら, 未発表)。

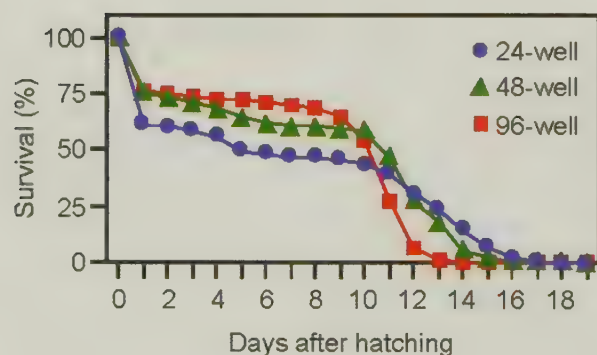


Fig. 1. Survival profiles of eel larvae in the 24-, 48-, and 96-well microplates (Modified from Unuma *et al.*, 2004). The survival rate was calculated as the percentage of the number of hatched larvae. Values represent the means $\pm$ standard deviations of larvae from six females.

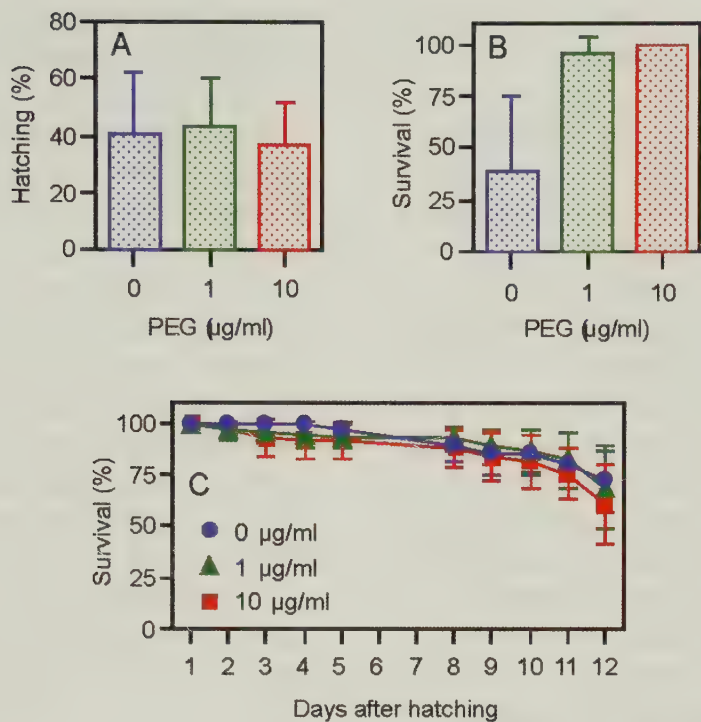


Fig. 2. Effects of polyethylene glycol (PEG) on hatching and larval survival of eel in the 48-well microplates (Modified from Unuma *et al.*, 2004). A) Hatching rate; B) Survival rate 1 day after hatching (DAH) as the percentage of the number of hatched larvae; C) Survival rate from 1 to 12 DAH as the percentage of the number of live larvae 1 DAH. Values represent the means $\pm$ standard deviations of larvae from five females.

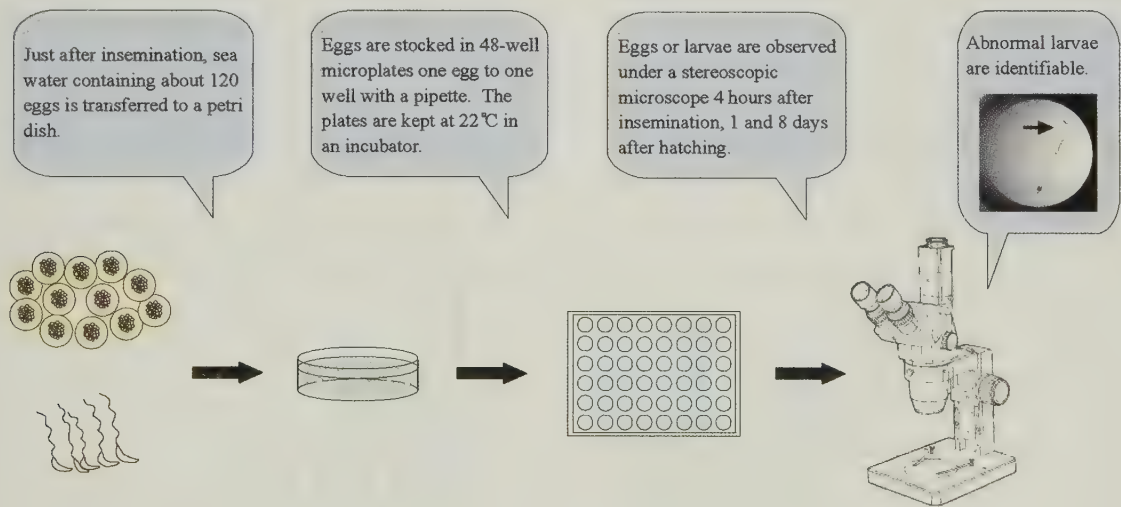


Fig. 3. Procedures for determining the rates of fertilization, hatching and survival in the Japanese eel by the individual rearing method.

同一サンプルによる受精率・ふ化率・生残率の測定

マイクロプレートでの個別飼育が摂餌開始までの生残率測定に非常に有効であることがわかったので、こ

の方法を応用して同一サンプルで受精率、ふ化率、生残率、形態異常率を測定する方法を考案した (Fig. 3)。採卵後、直ちに 2 g (約4,000個) の卵を量り取り、人工精漿 (Ohta *et al.*, 1996) で100倍に希釈した精子

1 mLで媒精し、100 mLの海水に懸濁する。よくかき混ぜながらカルスピペット（先端の太い駒込ピペット）で3 mL（約120個）を採取し、いったんシャーレに取って22°Cで保管する。シャーレ内の卵の総数が受精率・ふ化率などを計算する際の分母となる。ヘニシリンGカリウム塩（100,000 IU/L）、ストレプトマイシン硫酸塩（0.1 g/L）およびホリエチレングリコール6000（1 μ g/mL）を含む過海水を調製し、48穴プレートの各ウェルに1 mLずつ分注する。媒精2時間後に先端部の内径が2 mm弱のガラス製ピペット（短いほうが使いやすく、アズワンAI-0956-130が良好）を用いてシャーレの卵をマイクロプレートのウェルに1個ずつ移し（このとき明らかに死卵とわかる白濁した卵は捨てる）、飼育水の蒸発を防ぐため湿箱に入れるなどして10日後まで22°Cのインキュベータで保管する。期間中は酸欠を防ぐため、1、2日おきに湿箱を開けて換気をしたほうが良い。媒精4時間後（桑実期）、3日後（ふ化1日後）、10日後（ふ化8日後、摂餌開始期）の計3回、実体顕微鏡下で観察し、媒精4時間後には正常卵割、異常卵割、未受精の3段階、3日後には正常魚、異常魚、死亡、未ふ化の4段階、10日後には正常魚、異常魚、死亡の3段階に分類する。これにより受精率、正常卵割率、ふ化率、生残率（3日後および10日後）、形態異常率（3日後および10日後）を算出できる。ただし、形態異常については、生きたままの観察なので微細な異常の判別は困難であり、目の欠損、体躯の曲がり等、比較的目につきやすい異常の判別に留まる。最近、これまで正常と考えていた仔魚のなかにも、囲心腔の肥大や顎のめくれ等、子細に観察しないとわからない微

細な形態異常が多数含まれることがわかってきた（養殖研 黒川ら、未発表）ため、それらを容易に判別するための新たな方法を模索しているところである。

愛知県水産試験場内水面漁業研究所から分与された雌化ウナギを催熟し、16尾から得られた卵の卵質を上述の方法で判定した例を示す（Fig. 4）。このときには比較的良質な卵が得られ、人工授精に用いた卵数を100としたときの受精率、ふ化率、ふ化翌日の生残率、ふ化8日後の生残率の平均値は、それぞれ50.5%、35.2%、35.2%、31.4%であった。ただし、受精すら全くしないものからふ化8日後の生残率が80%に達するものまで、雌親魚ごとに値は大きくばらついた。また、データは示さないが親魚の由来が変わると平均値も大きく異なり、ときには何尾排卵してもまともな卵を得られないことすらある。今後は、このような雌親魚ごと、あるいは親魚の由来ごとの卵質のばらつきが何に起因するのかを明らかにし、それを改善していくことが肝要である。

まとめ

個別飼育を行えば、摂餌開始期までのウナギ仔魚の飼育も容易である。上述の方法は、ウナギの卵質判定の標準法として種苗生産技術開発に取り組む各県の水産試験場等にも採用していただき、研究機関相互の卵質データの比較が容易になった。また、マイクロプレートを用いた個別飼育は換水や死亡魚除去の必要がなく結果も安定しているので、他の魚種の卵質判定にも応用できるかもしれない。

本方法でやっかいな点があるとすれば、卵を1個

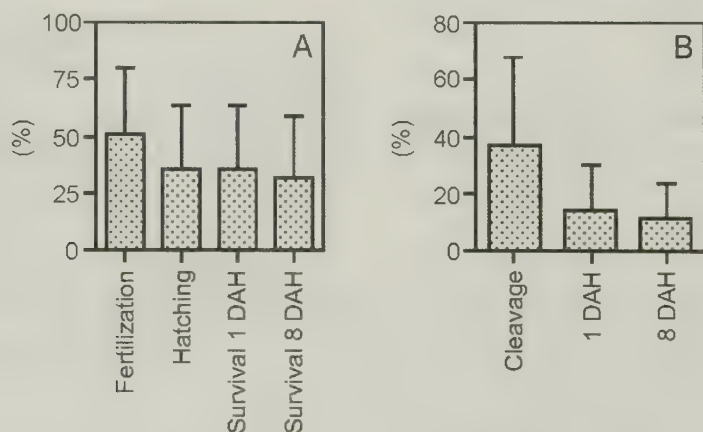


Fig. 4. Rates of fertilization, hatching, survival and abnormality of eel determined in the 48-well microplates (Unuma *et al.*, 2004). A) Fertilization, hatching and survival rates as the percentage of the number of eggs; B) Abnormality rate in cleavage and larvae. Values represent the means $\pm$ standard deviations for eggs and larvae from 16 females (A) or 14–15 females (B).

1個ピペットでウェルに移す操作であろう。細かい作業の苦手な人にとっては、初めのうちは非常に面倒でストレスの溜まる作業だと感ずるかもしれない。しかし、何回か繰り返せばすぐに慣れるし、48穴プレート1枚分を収容するのに要する時間はせいぜい5, 6分である。いったん収容してしまえば、その後の飼育も観察も極めて容易であり、その利点は大きい。

我々の担当課題「ウナギの卵質評価手法の確立と改善技術に関する研究」においては、本方法で雌親魚ごとに卵質を判定するいっぽうで、卵成分、卵比重などの卵の様々な性質について雌親魚ごとに分析し、卵質に影響を及ぼす要因を特定しようと試みた。その結果、未受精卵のビタミンE含量 (Furuita *et al.*, 2003), 未受精卵の比重 (Unuma *et al.*, 2005), および胚や仔魚の倍数性 (Ohta *et al.*, 2003) と卵質との間に相関関係のあることを見出した。卵質に影響するこれらの要因を制御できるようになれば、卵質を改善できると考えている。なお、各実験の詳細についてはそれぞれの論文を参照されたい。

文 献

- Furuita H., Ohta H., Unuma T., Tanaka H., Kagawa H., Suzuki N., and Yamamoto T., 2003: Biochemical composition of eggs in relation to egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish Physiol. Biochem.*, **29**, 37-46.
- Kaji T., Kodama M., Arai H., Tanaka M., and Tagawa M., 2003: Prevention of surface death of marine fish larvae by the addition of egg white into rearing water. *Aquaculture*, **224**, 313-322.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., and Hirose K., 1996: Changes in fertilization and hatching rates with time after ovulation induced by 17,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **139**, 291-301.
- Ohta H., Higashimoto Y., Koga S., Unuma T., Nomura K., Tanaka H., Kagawa H., and Arai K., 2003: Occurrence of spontaneous polyploids from the eggs obtained by artificial induction of maturation in the Japanese eel (*Anguilla japonica*). *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 517-518.
- Tagawa M., Kaji T., Kinoshita M., and Tanaka M., 2004: Effect of stocking density and addition of proteins on larval survival in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **230**, 517-525.
- Unuma T., Kondo S., Tanaka H., Kagawa H., Nomura K., and Ohta H., 2004: Determination of the rates of fertilization, hatching and larval survival in the Japanese eel, *Anguilla japonica*, using tissue culture microplates. *Aquaculture*, **241**, 345-356.
- Unuma T., Kondo S., Tanaka H., Kagawa H., Nomura K., and Ohta H., 2005: Relationship between egg specific gravity and egg quality in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Aquaculture*, **246**, 493-500.
- Yamaoka K., Nanbu T., Miyagawa M., Isshiki T., and Kusaka A., 2000: Water surface tension-related deaths in prelarval red-spotted grouper. *Aquaculture*, **189**, 165-176.

ウナギ仔稚魚の消化生理機能の発達過程を探る

黒川忠英^{*1}・鈴木 徹^{*1, *2}

Developmental process of digestive system in Japanese eel larvae

Tadahide KUROKAWA^{*1}, Tohru SUZUKI^{*1, *2}

Abstract To improve the larval rearing technology, the ontogeny of pancreatic exocrine function and its endocrine regulation systems were examined in the early larval stage of Japanese eel. The eel pancreas starts to synthesize the digestive enzymes by 8 days post hatching and the endocrine systems for the regulation of pancreatic enzyme secretion develop synchronously with the development of exocrine pancreas by the first feeding in eel larvae. Moreover, the digestive tract of eel larvae recognized Aquaran (freeze-dried shark egg powder) as a nutrient, and that the exocrine pancreas secreted digestive enzymes into the intestine and began to synthesize digestive enzymes in response to feeding.

Key words: eel, larvae, digestive system, pancreatic enzyme, endocrine system

長年の成熟誘起手法の改良によって、ウナギの受精卵を得ることは比較的安定して行えるまでになってきている(Kagawa *et al.*, 1995; 1997)。しかし、ふ化率や初期生残率がきわめて低い場合が多く、ウナギ種苗生産の実現のためには、さらに様々な観点からの技術改良が必要である(Tanaka *et al.*, 2001)。

魚類の初期発生においては、卵黄内の母性由来のmRNAや調節因子などの蓄積量の異常が斃死や奇形を引き起こす要因の一つになっていることが考えられる。また、仔魚の生残率の改善には仔魚用飼料の改良が不可欠であるが、そのためにはウナギ仔魚の消化吸收特性を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、ウナギ未受精卵から母性由来のmRNAを単離すると共に、それらの遺伝子発現と卵質との関連を検討することを試みた。また、仔魚やシラス期の消化器官などの発達過程を解析し、仔魚期の摂餌や消化吸收特性を明らかにすることを目的とした。

ウナギ未受精卵からのmRNAの単離

まず、未受精卵2gからtotal RNAを抽出し、未受精卵中のtotal RNAとmRNA含量を採卵親魚ごとに比較した。その結果、total RNAとmRNA含量にはロット間での差はみられず、その後の受精率やふ化率との相関は認められなかった。

次に、ふ化率が80%以上であった良質卵からmRNAの単離を行い、方向性性にベクターに組み込んだウナギ未受精卵cDNAライブラリーを作製した。このライブラリーの無作為シーケンスを行い、57種類の遺伝子を同定することができた(Table 1)。このうち、細胞骨格に関係するhiston、卵最終成熟に関与すると考えられるD7、アポトーシスに関与すると考えられるsurvivin、次世代の成熟に影響を及ぼすと考えられるmagonashi、プロテアーゼであるcathepsin Sとserin protease、プロテアーゼ阻害因子であるtrypsin inhibitorの5種類の遺伝子について、80%以上のふ化率が

2005年11月15日受理 (Received: November 15, 2005)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

^{*2} 現 東北大学農学部生物生産情報システム学研究室 〒981-855 仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 (Laboratory of Bioindustrial Informatics, Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan)

Table 1. Identified genes from unfertilized eel eggs.

Germinal vesicle breakdown maternal mRNA D7(1)	Cell membrane tight junction transmembrane protein claudin A(3)	Mitochondria proteins cytochrome B(3)
Cell cycle cyclin B1(3)	human putative membrane protein(1)	cytochrome C oxidase subunit I (4)
(1)C2 kinase(1)	Enzymes	cytochrome C oxidase subunit II (16)
(1)C20(1)	cathepsin S(1)	cytochrome C oxidase subunit III (6)
Cell growth	serine protease(1)	NADH dehydrogenase subunit I (1)
proliferation associated cytokine-inducible protein CIP29(1)	glutathion S-transferase(1)	Others
Apoptosis	E-1 enzyme, ubiquitin activation enzyme(1)	cacium-and integrin-binding protein CIB(1)
apoptosis regulator NR-13(2)	DNA topoisomerase I(1)	GM2 ganglioside activator protein(1)
survivin(2)	uracil-DNA glycosidase(1)	Unknown functions
Transcriptional regulators	Protease inhibitor	mouse RIKEN cDNA 1810020E01(1)
TATA-binding protein(1)	pancreatic secetory trypsin inhibitor(1)	mouse RIKEN cDNA 2310020H20(1)
ras-related nuclear protein Ran-a(2)	Transfer proteins	mouse RIKEN cDNA 2310004B22(1)
ras-related unclear protein Ran-b(1)	phosphatidylinositol transfer	mouse RIKEN cDNA 1600013p15(1)
e(y) 2 homologue(1)	protein beta isoform(1)	human clone MGC19825(1)
CCAAT binding transcription	Histones	human hypothetical protein FLJ20643(1)
factor-B subunit(1)	histone H1(2)	human hypothetical protein FLJ10342(1)
RNA-binding protein	histone H1-like(5)	human KIAA0101(1)
cold inducible RNA-binding protein(2)	histone H2A/e(1)	human similar to RIKEN cDNA 2010208K18(1)
mago nashi(2)	histone H2A/z(1)	human similar to CGI-130 protein(1)
small unclear ribonucleoprotein F(1)	histone H2B(9)	human cDNA DKFZp686N1651(1)
small unclear ribonucleoprotein E(1)	histone H3(2)	No homology
pre mRNA cleave factor I subunit(1)	Non-histone chromosomal proteins	(12)
Repairment of DNA	Similar to sperm specific antigen(1)	
SNM-protein(1)	High mobility group protein BOX2(1)	
Cytoskeletons	prothymosin(1)	
dynein light chain(1)	single strand D box binding factor(1)	
	Nopp 34 unclear phosphoprotein(1)	

Numbers of () indicate number of clones in this analysis.

得られた良質卵5ロットとほとんど孵化しなかった不良卵5ロット間で、遺伝子発現に差があるか否かを定量PCRにより比較した。しかし、いずれの遺伝子もロット間での有意差は認められなかった。

ウナギ仔魚期の消化生理機能の発達過程

ウナギ仔魚期には胃腺が未発達なため、消化の主体は膵臓由来の消化酵素群であると考えられる(Kurokawa and Pedersen, 2001; Kurokawa and Pedersen, 2003; Pedersen *et al.*, 2003)。そこで、まずウナギ外分泌膵臓から、各栄養成分に対する主要な消化酵素(タンパク質：トリプシン；糖質：アミラーゼ；脂質：リパーゼ)遺伝子を単離し、cDNA塩基配列を決定した(Kurokawa *et al.*, 2002)。これら、膵消化酵素遺伝子のウナギ仔魚における発現部位を、whole mount *in situ* hybridizatin (WISH)により観察した結果、仔魚の膵臓で特異的に遺伝子発現がみられることが確認された(Fig. 1)。次に、仔魚期における遺伝子発現パターンを、RT-PCRにより解析した(Fig. 1)。その結果、トリプシンとアミラーゼはふ化後6日目から発現がみられ7日から8日目にかけて発現量が増加して

いた。一方、リパーゼはふ化後8日目から遺伝子発現が観察された。これらのことから、ウナギ仔魚の膵臓では、摂餌を開始するふ化後8日目までに消化酵素の合成が開始されるものと推察された。

膵消化酵素の分泌は、消化管ホルモンであるCCK(分泌促進)やPYY(分泌抑制)などによって制御されていると考えられる。そこで、ウナギ小腸からCCKとPYY遺伝子を単離し、cDNA塩基配列を決定した(Kurokawa *et al.*, 2004)。ウナギ仔魚におけるCCKとPYY遺伝子の発現パターンを*in situ* hybridizatin (ISH)により観察した結果、これらのホルモン遺伝子はふ化後8日目から仔魚の腸管で発現し始めることが観察された(Fig. 2)。

したがって、ウナギ仔魚の外分泌膵臓における消化酵素合成能と、その内分泌制御機構は、摂餌開始時のふ化後8日目までに連動して発達することが明らかに

ウナギ膵消化酵素の消化特性

ウナギの膵液の消化特性を明らかにするため、ウナギ成体の膵臓の抽出液を調製し、タンパク質や糖質に

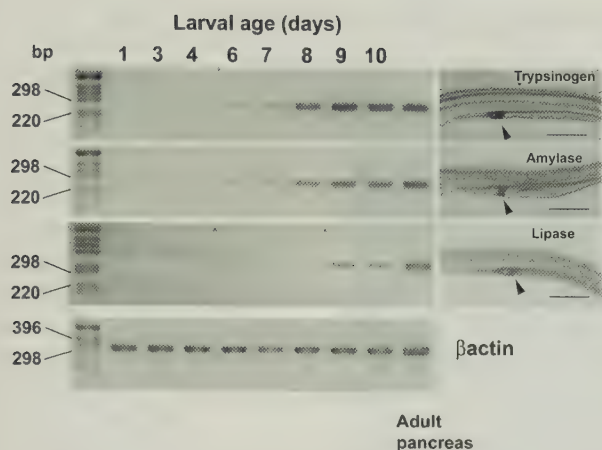


Fig. 1. RT-PCR analysis to expression of pancreatic enzymes in eel larvae and adult pancreas (left photo) and whole mount *in situ* hybridization of 10 dph eel larvae with antisense probes of pancreatic digestive enzyme genes (right photo). (a) trypsinogen, (b) amylase, (c) lipase. Arrowheads indicate the positive signals in the larval pancreas. Scale bars indicate 1 mm. (Modified from Kurokawa *et al.*, 2002).

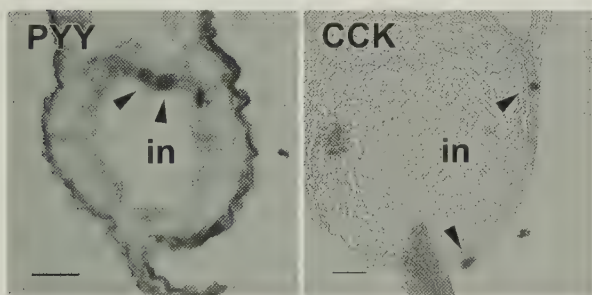


Fig. 2. Distribution of CCK and PYY cells in Japanese eel larvae at 8 dph. Arrowheads indicate positive signals. br, brain; ey, eye; in, intestine. Scale bars indicate 25 μ m.

対する消化試験を行った。ウナギ膵臓をアセトン処理して風乾したもの0.05 gを5 mLの10mM Tris-HCl (pH8.0) bufferで抽出したものを、原液とした。

この膵臓抽出液で、まずマーカータンパク質および仔魚用飼料の主成分である鮫卵の凍結乾燥品アクアランのタンパク質を25°Cで消化し、タンパク質に対する消化特性を解析した。その結果、マーカータンパク質は、10分以内に高分子は低分子に分解され、幅広いタンパク分子に対する消化能を有していた (Fig. 3)。一方、アクアランにはビテロゲニンと推察される2種類のタンパク質が主成分となっており、ウナギ膵臓抽出

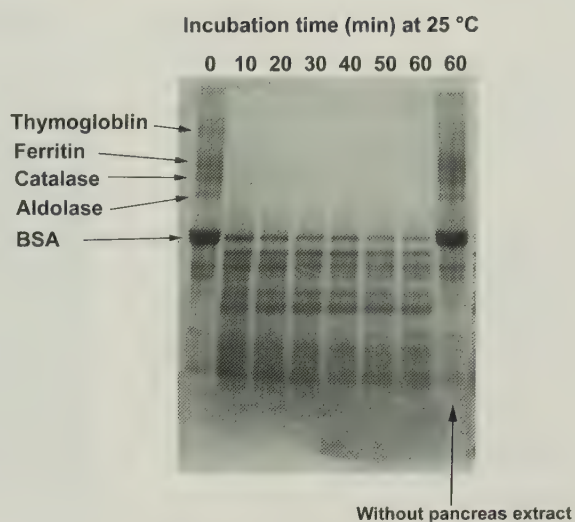


Fig. 3. Digestion of marker proteins by eel pancreatic extract.

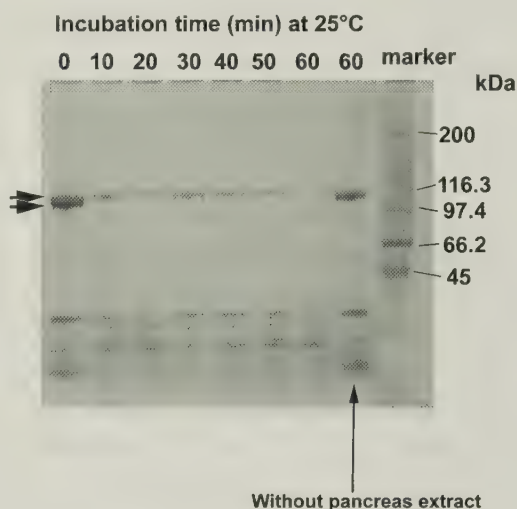


Fig. 4. Digestion of Aquaran proteins by eel pancreatic extract. Arrowheads indicate the two types of vitellogenin.

液により一方は10分以内に分解されたが、もう一種類は60分後も残存していた (Fig. 4)。

次に、レプトケファルス の体成分の特徴であるムコ多糖類に対する消化特性を検討した。ウナギ膵臓抽出液で、各種標品ムコ多糖類を消化した結果、タンパク質と異なり60分後でもいずれの分子も分解されなかった (Fig. 5)。

これらのことから、ウナギ仔魚の消化管における消化能力は、タンパク質の分解能力は高いが、ムコ多糖類の分解能力は低いものと推察された。

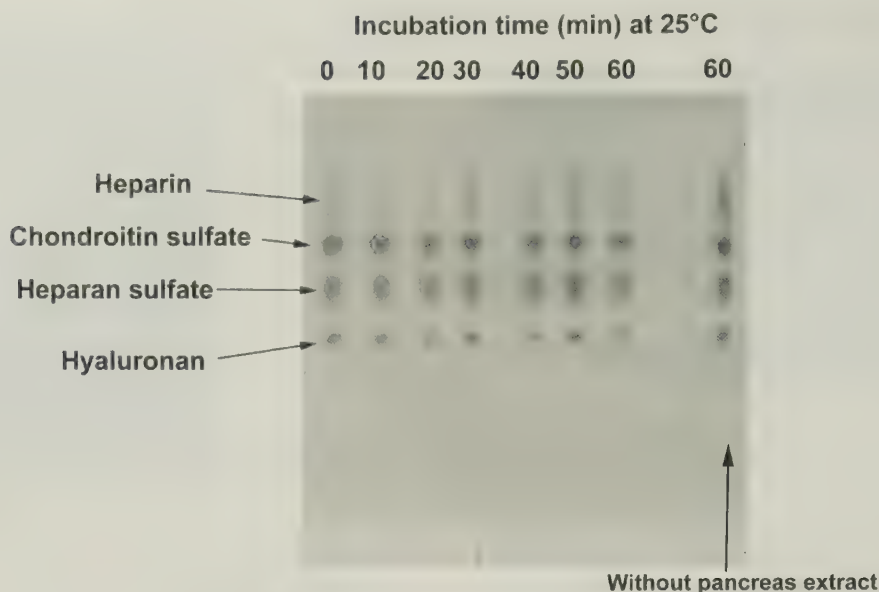


Fig. 5. Digestion of marker mucopolysaccharides by eel pancreatic extract.

ウナギ仔魚の摂餌特性

ウナギ仔魚の摂餌量を把握することができれば、仔魚用飼料の改良をより効率的に進めることができると考えられる。しかし、仔魚の摂餌量を求める手法は、ウナギに限らずいづれの魚種においても確立されていない。そこでまず、ウナギ仔魚の摂餌速度を推定する手法を検討した(Kurokawa *et al.*, 2004)。

飼料原料のアクアランをFITCで蛍光標識し、FITCの蛍光量からアクアランの量を算出できるように回帰式を作製した。次に、FITC標識アクアラン飼料を10日齢のウナギ仔魚に摂餌させ、摂餌後の時間経過による体内のFITC量の変化を測定し、取り込まれたアクアランの量を推定した。その結果、仔魚の摂餌速度は、アクアラン乾重量 $0.04 \mu\text{g}/\text{min}$ と推定された。このときの仔魚に含まれるトリプシン活性を、膵臓が含まれる領域と腸管が含まれる領域に分割してそれぞれ測定したところ、仔魚の摂餌後の腸管側のトリプシン活性は摂餌前に比較して約4.2倍に上昇していたが、膵臓側のトリプシン活性は有意な上昇はみられなかった。

これらのことから、10日齢頃の仔魚は、アクアラン乾重量で $0.04 \mu\text{g}/\text{min}$ 程度の摂餌速度で摂餌をする能力があり、仔魚の腸管内で人工飼料が栄養物として識別されて、膵臓から腸管にトリプシンなどの消化酵素が分泌されることが明らかになった。

おわりに

本研究によって、ウナギ仔魚期の消化器官やその機能の発達過程の概要を明らかにすることができた。ウナギ受精卵を 22°C で飼育した場合、ふ化後8日目から仔魚は摂餌を開始する。この時点までに、仔魚の消化の中心的役割を果たす膵臓の消化酵素合成能および、その内分泌的制御機構が整うことが明らかになった。また、仔魚用人工飼料の主成分であるアクアランを摂餌することにより、仔魚の消化システムに栄養物として認識され、膵臓から腸管への消化酵素の分泌が起こることも観察された。さらに、ウナギ膵臓の消化液により、アクアランのタンパク質が分解され高度に利用されていることも予想された。

一方、ウナギの良質卵と不良卵との違いを遺伝子レベルで明らかにする試みは、十分な成果を得るには至らなかった。ロットによっては、摂餌開始時点で形態異常魚が高い頻度で観察される場合が少なくない(養殖研 黒川ら, 未発表)。今後、良質卵と不良卵の違いを明らかにするためには、受精率やふ化率だけでなく形態異常魚の出現状況などさらに幅広い観点からの検討が必要と考えられる。

文 献

Kagawa H., Tanaka H., Ohta H., Okuzawa K. and Hirose K., 1995: *In vitro* effects of 17β -hydro-

- xyprogesterone and $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy- 4 -pregnen- 3 -one on final maturation of oocytes at various developmental stages in artificially matured Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Sci.*, **61**, 1012-1051.
- Kagawa H., Tanaka H., Ohta H., Okuzawa K. and Iinuma N., 1997: Induce ovulation by injection of $17\alpha, 20\beta$ -dihydroxy- 4 -pregnen- 3 -one in the artificially matured Japanese eel, with special reference to ovulation time. *Fisheries Sci.*, **63**, 365-367.
- Kurokawa T. and Pedersen B.H., 2001: Digestive system of eel larvae. Proceedings of the international symposium of Advances in eel biology, pp.92-94.
- Kurokawa T., Suzuki T., Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., and Unuma T., 2002: Expression of pancreatic enzyme genes during the early larval stage of Japanese eel *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, **68**, 736-744.
- Kurokawa T. and Pedersen B.H., 2003: The digestive system of eel larvae. in "Eel Biology" (eds. by Aida K., Tsukamoto K., and Yamauchi K.), Springer, Tokyo, pp.435-444.
- Kurokawa T., Iinuma N., Unuma T., Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., and Suzuki T., 2004: Development of endocrine system regulating exocrine pancreas and estimation of feeding and digestive ability in Japanese eel larvae. *Aquaculture*, **234**, 513-525.
- Pedersen B.H., Ueberschär B. and Kurokawa T., 2003: Digestive response and rates of growth in pre-leptocephalus larvae of the Japanese eel *Anguilla japonica* reared on artificial diets. *Aquaculture*, **215**, 321-338.
- Tanaka H, Kagawa H, and Ohta H, 2001: Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture*, **201**, 51-60.

ウナギ仔魚用飼料・飼育システムの開発

－ 世界で初めてシラスウナギの人工生産に成功 －

田中秀樹^{*1}・野村和晴^{*1}・山本剛史^{*2}・奥 宏海^{*1}

Development of artificial diets and rearing systems for eel larvae - The first success of production of glass eel in captivity -

Hideki TANAKA^{*1}, Kazuharu NOMURA^{*1}, Takeshi YAMAMOTO^{*2}, and Hiromi OKU^{*1}

Abstract Recently, a slurry-type diet made from shark egg yolk has been identified to be a suitable diet for captive-bred eel larvae. Although preleptocephalus larvae could be reared with this diet beyond the depletion of their yolk and oil droplet stores, it was still incomplete because the larvae could not be raised to glass eel. Then the biochemical compositions of eggs, larvae, and previous diets were analyzed and a new diet was designed by supplement of krill hydrolysate, phytase treated soybean peptide, vitamins, and minerals. A new rearing tank with a device which keeps the inner wall and the bottom of the tank clean by water current set up by water supply was also contrived. Larvae reared with the new diet in the new tank has grown to 50–60 mm in total length and begun to metamorphose into glass eel around 250 days after hatching. We have succeeded for the first time to rear the eel larvae to glass eel. However, the techniques for producing glass eels are not yet firmly established. Further studies should be focused on larval diets and the rearing regimes of the larvae to establish the techniques for consistent mass production of glass eels.

Key words: Japanese eel, *Anguilla japonica*, leptocephalus, larval rearing, artificial diet

ウナギ養殖の種苗となるシラスウナギの採捕量は減少傾向が続き、価格の高騰にともなう漁獲圧の高まりが天然資源に悪影響を及ぼすことが懸念されている。また、慢性的な種苗不足と大幅なシラス価格の変動は養鰻業の経営を不安定にし、日本の養鰻経営体数、生産量は減少の一途をたどっている。このような状況を打開するためには安定した種苗の供給が重要であり、ウナギ人工種苗生産の実現が急務とされてきた。しかしながら、1973年に北海道大学で世界初の人工ふ化に成功して以来 (Yamamoto and Yamauchi, 1974),

いくつかの研究機関で仔魚を得ることに成功したもの、給餌によってふ化仔魚を成長させた例はなかった。

独立行政法人水産総合研究センター養殖研究所では、1990年代の初めからウナギの人為催熟および人工授精技術の改良に取り組み、従来に比べると良質な受精卵、健全なふ化仔魚の得られる確率が飛躍的に増加した (Ohta *et al.*, 1997)。その結果、仔魚の飼育試験を計画的に行うことが可能となり、海産魚の初期餌料の定番であるワムシをあらかじめ培養し、様々な観点から

2005年12月24日受理 (Received: December 24, 2005)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦 422-1 (National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Nakatsuhamaura, Minami-ise, Mie 516-0193, Japan)

^{*2} 養殖研究所玉城庁舎 〒519-0423 三重県度会郡玉城町屋田 224-1 (Inland station, National Research Institute of Aquaculture, Fisheries Research Agency, Tamaki, Mie 519-0423, Japan)

給餌試験を実施することができた。我々は1994年にウナギ人工ふ化仔魚がワムシを食べることを初めて確認し (Tanaka *et al.*, 1995), ふ化後7日目頃から摂餌を始め, ワムシを消化吸収する能力があること (Kurokawa *et al.*, 1996), 19~28°Cの範囲では高水温ほど摂餌率, 摂餌量ともに高いこと, 明るい方がよく摂餌するが, 暗黒下でも少しは食べることを明らかにした。

しかし, 数年間にわたる精力的な努力にもかかわらず, ワムシの給餌ではウナギ仔魚は成長せず, 生存期間も最高18日にとどまった。そこで, 我々はもう一度原点に戻ってウナギ仔魚に有効な初期餌料の探索を行った。生物餌料 (生きたワムシのほかに冷凍ワムシ, 天然フランクトン, オタマボヤ, アルテミアなど), 市販餌料 (海産魚用初期餌料, 甲殻類用初期餌料, シラス餌付け用ペースト状餌料など), 栄養強化餌料 (魚卵粉末, 濃縮ナンノクロロプシス, DHA強化ユーグレナなど), その他 (イカ, エビ, クラゲ, エイのヒレ, ゼラチン, 鶏卵 (卵黄), イガいの生殖線, ウナギ卵, マダイ卵, ウナギ仔魚など) を試してみた。その結果, 餌料生物の栄養強化餌料として市販されていたサメ卵低温乾燥粉末 (商品名: アクアラン) を好んで食べることを発見し, サメ卵粉末を濾過海水に懸濁させた餌を用いてウナギ人工ふ化仔魚を長期間飼育する方法を開発した。しかし, サメ卵粉末のみからなる餌ではふ化後約1ヵ月間, 全長10mm程度まで成長させるのが限界で, 栄養的な欠陥があることが示唆された。その後, 餌の改良を中心にさらに研究を進め, サメ卵粉末をベースとし, 消化機能の十分発達していない仔魚で

も吸収しやすいオリゴペプチドを添加するとともにビタミン, ミネラルを強化し, これらの餌の材料をオキアミ抽出液に懸濁させた餌を考案した。その結果, 200日以上飼育に成功し, 大きいものは全長30mm以上のレプトケファルス幼生の段階まで到達した (Tanaka *et al.*, 2001)。しかしながら, 飼育管理に多大な労力を要する上に, 依然として飼料の栄養的欠陥に起因すると思われる発育不全や斃死が見られ, 成長, 生残ともに満足のいくレベルに達していないため, 本研究では飼育装置の改良と栄養・試料学的知見に基づく飼料の改良に取り組み, 飼育下でシラスウナギを作り出すことを目指した。

新たな飼育装置の開発

従来, ウナギ人工ふ化仔魚の給餌飼育には, 日本栽培漁業協会南伊豆事業場 (現水産総合研究センター南伊豆栽培漁業センター) でイセエビのフィロソーマ幼生飼育のために開発された容量5Lのアクリルボウル水槽を使用してきたが, 収容尾数が約200尾に限られる上, 残餌の洗浄に多大な労力を要し, 大量の仔魚を長期間飼育するには問題があった。

そこで, アクリル樹脂を素材として, 注水の力で水槽全体に水流を起こして残餌等を自動的に洗い流し, 中心部の排水管から効率よく流出させることを目的として, 新たな水槽を考案し, 試作した (Fig. 1)。これらの水槽は, 長さ50cm, 直径25cmの円筒を横置きにし, 上部を切り取って両端を塞いだ形状で, 底面を平らにした平底型 (Fig. 1A) と底面も連続する曲面に

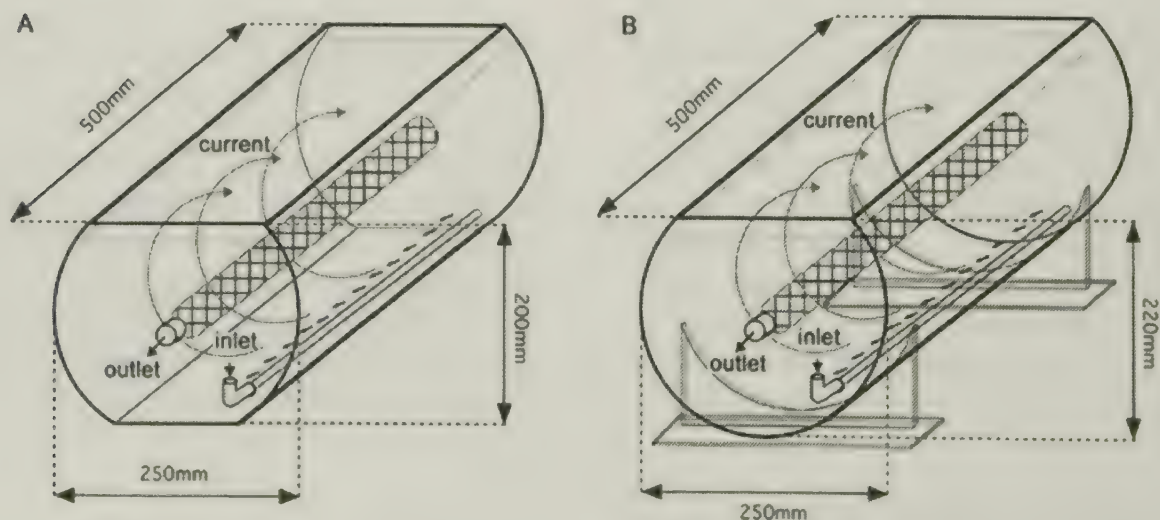


Fig. 1. Two types of newly designed rearing tank for eel larvae. A. Flat bottom carousel tank, B. Round bottom carousel tank.

なっている丸底型 (Fig. 1B) の 2 種類である。いずれも、斜め下部の壁面付近に設置したほぼ全長にわたるノズルから壁面に沿って海水を射出して水槽内に長軸を中心とした水流を起こし、軸方向中心部に配置したほぼ全長にわたるストレーナーから排水する構造となっている。水槽底面付近に水流を起こすことによって残餌を洗い流し、死骸や糞が沈殿するのを防ぎ、元気な仔魚がこれら汚染原因物質と接触する機会を減少させるとともに、水槽全体の飼育水を回転させることによって水質の均一化を図り、速やかに水槽内の汚れを排出することを目的としている。

内径 9 mm、外径 13 mm、長さ 48 cm の透明塩ビパイプに直径 1 mm の穴を 5 mm 間隔で一列に 94 個あけた注水ノズルを設置し、水槽壁面に沿って射出するように 1.0 L / 分の注水を行うと、丸底型では水槽の基部から末端部まで水槽底面付近において 4.0 ~ 5.0 cm / 秒のほぼ等しい流れを起こすことができた。実際に飼育試験を行ってみると、底を平らにした平底型は残餌の水洗機能ではやや劣ったが、初期の餌付けには優れており、どちらも従来のアクリルボウル水槽より少ない労力で 1 水槽あたり 1,000 ~ 2,000 尾の仔魚 (日齢 8) の飼育が可能であった。

卵、仔魚および餌の一般成分とアミノ酸組成の分析

餌の改良のための基礎的知見を得る目的で、ウナギ仔魚等の生物試料 (ウナギ排卵卵、ウナギふ化仔魚 (日

齢 0)、給餌開始時 (日齢 8)、20 日間給餌後 (日齢 28)、変態直前のレプトケファルス (日齢 436)、天然シラスウナギ、アナゴレプトケファルス) およびウナギ仔魚の飼育に用いた試験飼料 (AP' 10 / F、ACc10 / F、ACc10 (T / K)) と飼料原料 (アクアラン、カゼインカルシウムペプチド、大豆ペプチド (ハイニユート PM)、オキアミ自己消化物、オキアミエキス) の一般成分組成、遊離アミノ酸組成および加水分解物のアミノ酸組成等を分析し、比較した。

一般成分組成のうち、水分は 110℃ で 8 時間乾燥、灰分は 600℃ で 5 時間加熱、粗タンパク質はセミミクロケルダール法、総脂質はメタノールクロロホルム抽出法により定量した。遊離アミノ酸組成は、0.6 規定過塩素酸により一昼夜抽出し、日立アミノ酸分析計 L8500 により分析した。加水分解物のアミノ酸組成については、トリプトファンは 4.2 規定水酸化ナトリウムにより 110℃ で 24 時間加水分解し、島津高速液体クロマトグラフにより、シスチンは過蟻酸により氷冷下で 4 時間酸化した後溶媒を除去し、6 規定塩酸にて 110℃ で 18 時間加水分解し、日立アミノ酸分析計 L8500 により、これら以外のアミノ酸については 6 規定塩酸にて 110℃ で 22 時間加水分解し、日立アミノ酸分析計 L8500 により定量した。

ウナギ卵および仔稚魚の一般成分組成を比較すると、シラスウナギへの変態に伴い水分含量が低下し、タンパク質含量が増加した (Table 1)。脂質含量は卵およびふ化仔魚では高く、油球をほぼ吸収し終えたふ化後

Table 1. Proximate composition of eel eggs, eel larvae, conger eel larvae, ingredients of diets, and experimental diet

	Moisture (%)	Crude protein (%)	Total lipids (%)	Ash (%)
Eel eggs	87.9	7.2 (59.5 ^{*3})	4.2 (34.7 ^{*3})	1.0 (8.3 ^{*3})
Eel larvae (0 dph ^{*1})	89.9	6.7 (66.3)	3.9 (38.9)	1.2 (11.9)
Eel larvae (8 dph)	91.8	7.2 (87.8)	1.3 (15.9)	0.9 (11.0)
Eel larvae (28 dph) ^{*2}	—	5.5	—	—
Eel larva (436 dph) ^{*2}	—	8.5	—	—
Wild glass eel	81.6	12.8 (69.6)	2.8 (15.2)	1.7 (9.2)
Conger eel leptocephalus	92.8	4.5 (62.5)	1.3 (17.5)	1.4 (19.4)
Shark egg powder (Aquaran)	1.7	52.1 (53.0)	57.9 (58.9)	3.2 (3.3)
Soybean peptide (Hinute PM)	5.6	83.9 (88.9)	—	6.1 (6.5)
Casein calcium peptide	6.4	85.4 (91.2)	—	3.3 (3.5)
Krill hydrolysate	11.6	65.6 (74.2)	15.7 (17.8)	13.0 (14.7)
Experimental diet (AP' 10 / F)	71.3	16.3 (56.8)	15.1 (52.6)	1.3 (4.5)

^{*1} Days post hatching.
^{*2} Only crude protein was analyzed.
^{*3} On dry matter basis.

8日目以降は低下した。日齢8以降のウナギ仔魚の一般成分は天然のアナゴのレプトケファルスと比較的類似していると推定された。飼料原料の内、アクアランは脂質含量が高く、試験飼料はアクアランが主原料となっていることからタンパク質と脂質の比が約1:1であった。

遊離アミノ酸組成については、サンプル数が少ないので比較が困難であるが、排卵卵からふ化後8日目にかけて遊離アミノ酸合計量が減少した。これは卵では浮力獲得及び発生におけるエネルギー基質として遊離アミノ酸が重要であることを裏付けていると考えられる。この間、多くのアミノ酸が減少し、特にふ化に伴うグルタミンの減少が著しかった。ただし、ふ化に伴って中性の必須アミノ酸は減少していないが、8日目には減少していた。また、タウリンは8日目まで増加していた。一方、8日目と天然シラスを比較すると、多くのアミノ酸が減少していたが、タウリン、グリシン、アラニン、 β アラニン、GABA及びカルノシンは増加していた。特に β アラニン、GABA及びカルノシンの増加が著しいのが特徴的であった。飼料原料のうちアクアランには尿素が極めて多かった。オキアミ抽出物には各アミノ酸および関連物質がかなり豊富に含まれていた。カゼインカルシウムペプチドおよびハイニュートPMは過塩素酸可溶性の低分子ペプチドが多いために測定が不可能であったが、試験飼料の遊離アミノ酸組成はおおむね主原料であるアクアランのそれを反映しているようであった。試験飼料のタウリンは乾物換算するとアナゴレプトケファルスよりはかなり少なかった。

加水分解物のアミノ酸組成を粗タンパク質（16g窒素）中の百分率で比較すると、アナゴレプトケファルスではセリン、アラニン、メチオニン、ロイシン、芳香族アミノ酸、リジン、アルギニン、プロリンなどがウナギ卵およびふ化仔魚より少なかったが、これらのうち非必須アミノ酸はウナギでも卵からふ化仔魚になるにつれて減少する傾向があった。ウナギ仔魚ではふ化後28日目から436日目までに多くのアミノ酸が増加しており、特にスレオニン、ロイシン、ヒスチジン及びプロリンで顕著な増加が見られた。ふ化後436日目のレプトケファルスと天然シラスを比較すると、塩基性アミノ酸であるアルギニンの増加が顕著で、さらにリジン、ヒスチジンが増加し、プロリンが減少していた。このことから、レプトケファルスからシラスウナギへの変態の前後で魚体を構成しているタンパク質の種類あるいは各種タンパク質の構成比率に変化があったと考えられた。試験飼料では生物試料に比べてグリシン、アラニンなどが少なく、イソロイシン、ロイシン、ア

ルギニンなどが多かった。しかしながらアクアランには尿素が多く、また試料によっては加水分解で定量される通常のアミノ酸以外の窒素化合物も多いと考えられる。必須アミノ酸バランスの比較のためにA/E比（各必須アミノ酸含量 $\times 1000$ / 全必須アミノ酸含量、ただし、メチオニンはシスチンと、フェニルアラニンはチロシンとの合計量で計算した）を見ると、飼料原料のうちアクアランは生物試料に比べてアルギニン、イソロイシン、ロイシンが多く、リジン、芳香族アミノ酸が少なかった。ハイニュートPMではアルギニン、芳香族アミノ酸が多く、リジン、スレオニンがやや少なかった。カゼインカルシウムペプチドではロイシン、芳香族アミノ酸が多く、アルギニンが極端に少なく、スレオニンもやや少なかった。オキアミ自己消化物では含硫アミノ酸、スレオニンがやや多いが、ヒスチジン、芳香族アミノ酸は少なかった。カゼインカルシウムペプチドおよびオキアミ自己消化物のバリンはアクアランやハイニュートPMよりは多かった。

以上のことから、アナゴレプトケファルスにはウナギ排卵卵やふ化仔魚に比べて遊離のタウリンおよび β アラニンが豊富に含まれており、またタンパク質を構成するアミノ酸ではバリンの比率がやや高く、アルギニンがやや低い傾向が見られた。タウリンは海産魚の成長や緑肝症の予防に有効であることが報告されている。 β アラニンはヒスチジンまたはメチルヒスチジンと化合してカルノシンまたはアンセリンとなり、これらイミダゾール化合物は魚類でも筋肉における緩衝作用があることが報告されているが、アナゴレプトケファルスにはカルノシンやアンセリンは検出されなかった。今回分析した飼料原料はそれぞれ特徴的なアミノ酸組成を有しており、それらを必要に応じて適当に組み合わせることにより、様々な特徴のあるアミノ酸組成の飼料の作製が可能であると考えられる。また、ウナギ仔魚が特異的に嗜好性を示すサメ卵粉末（アクアラン）には尿素が多いことが特徴的であった。

ウナギ仔魚の成長に伴う

グリコサミノグリカン組成の変化

多糖の一種であるグリコサミノグリカン（GAG）は一般的にレプトケファルス型仔魚の重要な体構成成分の一つである。GAGはウロン酸とアミノ糖を構成糖とし、機能的には体構造を維持するほか、変態時には代謝されてエネルギー源としての役割を果たすといわれている（Pfeiler, 1991, 1996）。ウナギ成長過程における糖組成変動の特徴を明らかにするため、ふ化直後（日齢0）、摂餌開始直後（日齢9）、約4週間摂餌後

(日齢30), レプトケファルス(日齢436)のウナギ人工ふ化仔魚, 変態直前のアナゴレプトケファルスおよび天然シラスウナギの構成多糖の組成を分析した。

各サンプルから多糖成分を抽出・精製し, 一般糖, ウロン酸, アミノ糖の含量をそれぞれ特異的発色法により比色定量した。中性糖含量については一般糖含量からウロン酸含量を差し引くことによって求めた。さらに特異的分解酵素への感受性を利用し, 精製GAGの定性分析を行った。

総多糖は各サンプル湿重量の0.2~0.4%を占め, ウナギ仔魚の成長に伴いウロン酸とアミノ糖が相対的に増加し, 中性多糖は減少した。ウナギ(日齢436)およびアナゴのレプトケファルスではその多糖成分はウロン酸およびアミノ糖が大半を占め, 中性糖は極めて少量しか含まれていなかった。シラスではレプトケファルスと比べてウロン酸およびアミノ糖の相対含量は低く, 中性糖の割合が高かった。Fig. 2に見られるこれらの分析結果はウナギ仔魚の成長過程における糖組成変動の特徴を示していると考えられる(Fig. 2)。また定性分析によりふ化時にはGAGとしてヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸, ヘパラン硫酸を含んでいることが確認されたが, 仔魚の成長に伴いヒアルロン酸の相対的含量が増加し, 日齢436日のウナギレプトケファルスではアナゴレプトケファルスと同様にヒアルロン酸がGAG成分の大半を占めることが明らかとなった。

以上の結果から, ウナギ仔魚の成長過程での糖組成

変動の定量的・定性的特徴が明らかとなった。また変態直前のアナゴレプトケファルスとの比較から日齢436日まで人工飼育下においてもGAGは正常に合成されていることが確認された。現在ウナギ仔魚の飼育にはサメ卵, 大豆ペプチドおよびオキアミを主成分とした飼料を使用しているが, 現時点では新たにGAG生合成の材料となる成分を添加する必要はないと考えられた。

新たな餌の開発と仔魚の成長・変態

従来, ワムシの栄養強化用飼料として市販されてきたサメ卵粉末(アクアラン)を主成分とした餌を用いてウナギ仔魚飼育試験を行ってきたが, 2001年にアクアランが製造中止となり入手できなくなったため, 代替餌材料を緊急に探し出すことが必要となった。幸いにも, アクアランの原料である冷凍サメ卵ペースト(アクアベース)が入手できたので, 水分含量の違いを考慮に入れてアクアランまたは冷凍サメ卵ペーストに, 大豆ペプチド, オキアミ自己消化物を添加した飼料を作製し, 日齢8から10日間の飼育試験を行ってウナギ仔魚の成長・生残を比較した。その結果, サメ卵ペーストを主成分とする餌は, 従来のアクアランを用いた餌とほぼ同等の成長・生残を示し, ウナギ仔魚飼料の主な材料として使用可能であることが明らかになった。

次に, 飼料のアミノ酸組成の改善を目的として, ふ化仔魚やシラスと従来与えていた飼料(サメ卵80%,

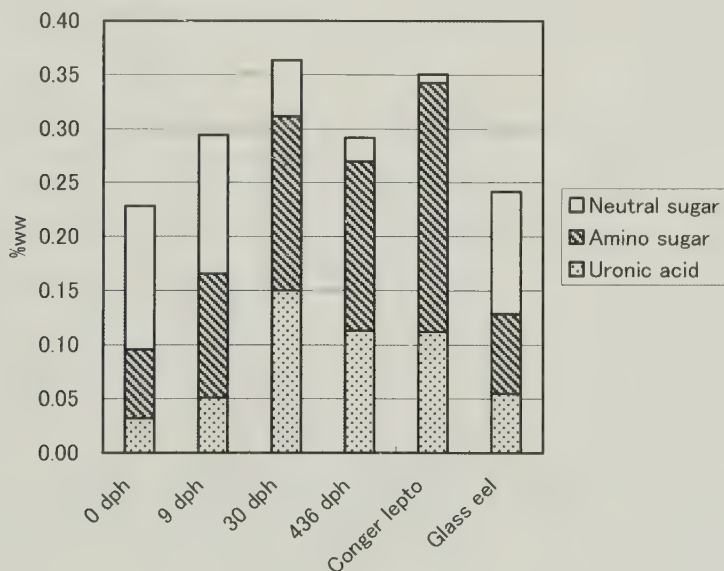


Fig. 2. Changes in the sugar composition of polysaccharide extracted from eel larvae from 0 day post hatching (dph) to glass eel.

大豆ペプチド10%, オキアミ自己消化物10%) のアミノ酸分析値を比較し, サメ卵には少ない芳香族アミノ酸を豊富に含むカゼインカルシウムペプチドや結晶アミノ酸(タウリン, スレオニン, バリン, メチオニン, ヒスチジン, リジン) を添加した飼料を試作した(Table 2)。ふ化後8日目のウナギ人工ふ化仔魚を供試魚として10日間の飼育試験を行い成長・生残を比較したところ, カゼインカルシウムペプチド添加区では成長・生残ともに従来の飼料より劣り, 結晶アミノ酸添加区も従来の飼料に比較して成長の改善は見られず, 生残率は若干低下した(Table 2)。これらの結果から, 現在までのところアミノ酸組成の調整による飼料の改善には成功していない。

本研究開始以前の飼料は, 日齢8~17まではアクアラン80g, 大豆ペプチド20gを250mLの蒸留水に懸濁させたもの, 日齢18以降はアクアラン80g, 大豆ペプチド20gにビタミンプレミックス3.5g, ミネラルプレミックス1.5gを加え, 270mLのオキアミ抽出液に懸濁させたものを用いていた。この飼料を用いた飼育では日齢100で全長20mm前後, 日齢209で31mmに達したのが最高であった(Tanaka *et al.*, 2001)。しかし, この飼料ではその後数年間の努力にもかかわらず, この成績を上回る飼育結果は得られなかった。

その後, 本研究と平行して実施した不二製油株式会社との共同研究により, 従来の大豆ペプチドはフィチン酸というリン化合物を含み, 仔魚がミネラルやタンパク・ペプチド等を吸収するのを阻害する恐れがあること, 酵素処理によってフィチン酸を低減することが可能なこと等が示され, また, 日本水産株式会社との共同研究ではオキアミ自己消化物がウナギ仔魚用飼料

の成分として有望なことが示された。

以上の知見を総合して冷凍サメ卵ペーストにフィチン酸低減大豆ペプチド, オキアミ自己消化物を添加した飼料で日齢8から10日間, その後は, これにオキアミ抽出液, ビタミン・ミネラル混合物を添加した飼料を毎日5回給餌して, 丸底回転水槽を用い水温21.5℃で長期飼育試験を実施した。その結果, 日齢100で全長20~30mm, 日齢250前後で天然のレプトケファルスが変態を開始する全長50~60mmに達し, 肛門や背鰭基部の位置が前進し, 体高が低くなるなどの形態変化が見られた個体は, 約20日間でシラスウナギに変態した(Fig. 3) (Tanaka, 2003; Tanaka *et al.*, 2003)。

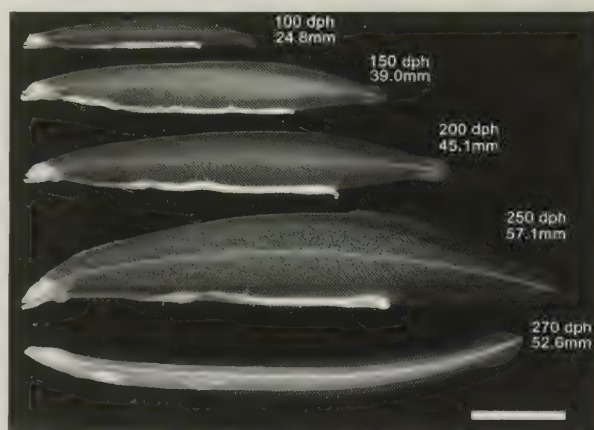


Fig. 3. Growth and metamorphosis of captive-bred Japanese eel (after Tanaka *et al.*, 2003). Age in days post hatching (dph) and total length are indicated. Scale bar=10mm.

Table 2. Comparison of growth and survival rate between amino acid supplemented diets

Experimental group	Age (days)	Number of fish	Survival rate (%) ^{*1}	Total length (mm) ^{*2}	Body depth (mm) ^{*2}
Initial	8	30	—	6.47±0.23	0.642±0.037
Control ^{*3}	18	60	42.00±3.97	9.36±0.49 ^a	1.052±0.107 ^a
A ₁ ^{*4}	18	89	30.40±7.99	9.33±0.36 ^a	1.046±0.061 ^a
CCP ^{*5}	18	47	17.37±3.39	8.90±0.54 ^b	0.962±0.102 ^b
CCP・A ₂ ^{*6}	18	76	13.04±5.71	8.99±0.44 ^b	0.992±0.090 ^b

^{*1} Mean±SD of 3 tanks of each experimental group.

^{*2} Values followed by the same letter are not significantly different in each column ($p<0.05$).

^{*3} Shark egg (dry weight) 80 : Soybean peptide 10 : Krill hydrolysate 10.

^{*4} Shark egg (dry weight) 80 : Soybean peptide 10 : Krill hydrolysate 10+Tau 1.00,Thr 0.48,Val 0.16, Met 0.50,Lys 1.32,His 0.60.

^{*5} Shark egg (dry weight) 60 : Casein calcium peptide (CCP)20 : Soybean peptide 10 : Krill hydrolysate 10.

^{*6} Shark egg (dry weight) 60 : CCP 20 : Soybean peptide 10 : Krill hydrolysate 10+Tau 1.00,Thr 0.40,Val 0.05,Met 0.50,Lys 0.76,His 0.50.

おわりに

本研究の成果により、効率的な飼育水槽が開発されるとともに、仔魚や飼料原料の成分が解明され、サメ卵を主成分とする飼料の給餌によってレプトケファルスとして正常と思われる発育、成長を示し、シラスウナギに変態させることに成功した。しかしながら、依然として初期の生残率は低く、成長は天然に比べて遅く、長期にわたる飼育中の減耗も大きい。また、健全なシラスウナギが得られる確率も極めて低いことから、今後は親魚養成法や人為催熟法を改善し、卵や仔魚の質を高め、ふ化後各段階での飼料の改良や飼育技術の高度化が必要と考えられる。

文 献

- Kurokawa T., Tanaka H., Kagawa H., and Ohta H., 1996: Absorption of protein molecules by the rectal cells in eel larvae *Anguilla japonica*. *Fish. Sci.*, **62**, 832-833.
- Ohta H., Kagawa H., Tanaka H., Okuzawa K., Iinuma N., and Hirose K., 1997: Artificial induction of maturation and fertilization in the Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Fish. Physiol. Biochem.* **17**, 163-169.
- Pfeiler E., 1991: Glycosaminoglycan composition of anguilliform and elopiform leptocephali. *J. Fish Biol.*, **38**, 533-540.
- Pfeiler E., 1996: Energetics of metamorphosis in bonefish (*Albus* sp.) leptocephali: Role of keratan sulfate glycosaminoglycan. *Fish Physiol. Biochem.*, **15**, 359-362.
- Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., Okuzawa K., and Hirose K., 1995: The first report of eel larvae ingesting rotifers. *Fish. Sci.*, **61**, 171-172.
- Tanaka H., Kagawa H., and Ohta H., 2001: Production of leptocephali of Japanese eel (*Anguilla japonica*) in captivity. *Aquaculture* **201**, 51-60.
- Tanaka H., 2003: Techniques for Larval Rearing. In "Eel Biology" (eds. Aida K. Tsukamoto K., and Yamauchi K.), Springer-Verlag, Tokyo, pp.427-434.
- Tanaka H., Kagawa H., Ohta H., Unuma T., and Nomura K., 2003: The first production of glass eel in captivity: fish reproductive physiology facilitates great progress in aquaculture. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 493-497.
- Yamamoto K. and Yamauchi K., 1974: Sexual maturation of Japanese eel and production of eel larvae in the aquarium. *Nature*, **251**, 220-222.

生態系保全・遺伝的多様性確保を可能とする 効果的種苗放流技術開発の試み

放流技術チームリーダー
福田雅明*

An approach to establish artificial reseedling techniques for the conservation of biodiversity and ecosystems in fisheries stock enhancement

Masaaki FUKUDA*

近年、我が国周辺の沿岸域水産生物資源は全体的に低水準にあることから、種苗放流等による積極的な資源造成が、水産基本計画等において我が国の重要施策として位置付けられている。重要魚介類の種苗生産、種苗放流を中心として、1963年に瀬戸内海をモデル海域として始められた栽培漁業は、1980年代以降全国的に発展・展開し、2003年の種苗放流対象種は83種にのぼり、放流数は魚類で約7.7千万尾、甲殻類で2億3千万尾、貝類で246億個となっている。しかし、一部の魚種を除いて、高い放流効果が得られているとは必ずしも言えず、種苗の生産から効果的な放流に至る一連の技術の体系化が強く望まれている。種苗放流による効果的な資源添加を困難にしている原因は魚種毎に様々であるが、問題点を整理すると幾つかの要因に集約することができる。すなわち、1) 初期生活史に関する知識の不足、2) 放流対象種の地域集団に関する知見の不足、3) 種苗の資源添加、再生産等に係る定量的評価法の不足である。一方、近年国際的な潮流から、種苗放流による天然個体群の遺伝的多様性並びに生態系に与える影響の大きさが指摘され、放流種苗が野生集団に与える影響を解明し、その実態を常に監視することの必要性が叫ばれるようになった。

近年、分子生物学的手法の急速な発達に伴いミトコンドリアDNA解析等によって、遺伝的集団の把握、親子関係の特定、胃内容物から被食者を特定する技術等が開発されており、これらを応用することで現在問題となっている放流魚による遺伝的攪乱や生態特性の定量化に向けた解決が可能となってきた。一方、生態系の保全を巡る国際的な趨勢から、我が国も放流種苗が天然資源及び生態系に与える影響を的確に評価することを前提とした生態系保全型増養殖システムの構築が必要となっているが、この分野においても最新の分子生物学的手法の応用が可能である。

そこで、水産総合研究センター交付金プロジェクト「生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発（栽培プロ研）」の第1期では、磯根資源のアワビ類、沿岸資源のヒラメ及び淡水資源のアユをモデル対象種とし、初期生活史に関して不明な部分を解明するとともに、分子生物学的手法を含めた最新の技術を用いて、野生集団の遺伝的構造の把握、放流魚の遺伝的特性の解明、放流魚の量的変動の定量化手法の開発を目的とし、生態系の保全及び遺伝的多様性に配慮しつつ、効果的な資源添加を実現するために必要な技術的な基礎を確立することとした。

アワビ類では人工種苗放流による資源量増大が図られているが、1970年以降漁獲量は急速に減少し始め、効果的な放流技術の開発が望まれている。しかし、適切な放流を可能とするために必要な天然資源の再生産過程はほとんど明らかにされておらず、特に暖流系アワビ3種の幼生、稚貝については種判別さえも不可能な状態にある。そこで、アワビ類については、まず発育初期個体の種判別技術を開発し、それを用いて発生初期の分布量や餌料環境等の情報から生残率の定量的評価を試みるとともに、遺伝的多様性を評価するための手法を開発することとした。ヒラメでは栽

* 北海道区水産研究所、〒085-0802 北海道釧路市桂恋116 (Hokkaido National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, 116, Katsurakoi, Kushiro, Hokkaido 085-0802, Japan)

培魚業の教科書的魚種であることから、天然魚や放流魚の生態に関して多くの知見が蓄積されている。しかし、これらの知見は着底場や着底期に関する情報が大半を占めるとともに定性的な知見にとどまっていることが多い。また、ヒラメは放多くの地域集団が存在する可能性があり、放流がそれらの集団の遺伝的構造に与える影響も懸念されている。そこで、効果的なヒラメの放流を実現するために、放流魚を含めた稚魚・未成魚の数量変動に係わる定量的評価法の確立、放流魚の遺伝的特性および地域集団の遺伝的構造の把握、数量変動に最も影響を与える環境収容力の数量的評価を目指した。アユの種苗放流は全国各地で展開され、寸断した河川に再び漁場を提供するなど、着実な効果が上がっているが、近年、天然資源の減少傾向がみられ、放流資源の回収にとどまらない天然資源の再生を目的とした放流技術の開発が望まれている。しかし、放流魚が河川生態系に与える影響は種内、種間ともに不明な点が多く、また、河川あるいは地域集団の遺伝的構造が不明な上、海域を通じた遺伝的交流の実態を評価する上で重要な仔魚の生態に関する情報はほとんど無い。そこで、アユについては海域における仔魚の生態解明、日本全国にわたる遺伝的構造の解明、河川における数量変動の定量的評価、放流が河川生態系に与える影響の評価に取り組んだ。

栽培フロ研の第1期においては、従来の調査・解析技術では解明が困難であった分野に分子生物学等の最新の手法を応用して、基礎技術の開発及び確立、新たな知見の蓄積を中心として研究を推進し、後段の各論文に示されるように貴重な知見、興味ある事実等が次々と明らかとなった。これらの成果は第2期に向けた基礎固めであるとともに、生態系の保全、遺伝的多様性の確保を可能とする効果的な種苗放流技術の体系化に向けて大きな一歩を踏み出したものと確信している。

アワビ類の資源増殖を目指して

アワビサブチームリーダー
堀井豊充*

Summary of studies done by the "Awabi" group with the aim of elucidation of prerequisite for stock enhancement of abalone

Toyomitsu HORII*

アワビ類は、我が国において最も重要な磯根資源のひとつであり、人工種苗の放流による資源増殖対策が各地で展開されてきた。しかし、1970年代以降、その漁獲量は急速な減少傾向を示している。この減少傾向は、寒流系アワビ（エゾアワビ）では1970年代から、また暖流系アワビ類（クロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビ）では80年代後半から認められるようになった。エゾアワビでは90年代後半から一部の水域で漁獲量の回復傾向が認められてきているものの、未だに70年代のような高位の水準には戻っていない。一方、暖流系アワビ類では回復の兆候は認められず、減少傾向が引き続いており、天然の再生産による加入量の減少が懸念されているところである。アワビ類資源量の長期および短期での変動要因については、漁獲による影響に加え、エゾアワビでは海水温などの海況変動との関連が示唆されているものの、総じて未解明の部分が多い。

一方、こうした資源変動において、放流人工種苗も少なからぬ影響を及ぼしてきたと考えられる。それは漁獲個体に占める放流個体の割合（混獲率）が50%を上回る水域も稀でないことから明らかである。しかし、放流種苗の漁獲回収という、漁場の一時利用という観点からの放流効果に関しては多くの調査・研究事例があるものの、再生産への寄与など放流個体が資源変動に与えてきた影響という観点からの評価は、これまで十分になされてこなかった。人為的な資源添加によって漁獲量の維持・増大を図るという栽培漁業の本来的な目的を果たすためには、天然資源の変動要因と、放流による資源添加の条件を解明する必要がある。このように、アワビ類の資源増殖を図るうえでは、数多くの問題を一つ一つ地道に解決していく必要があるが、本プロジェクト研究においては以下の5つの研究課題を立てた。

暖流系アワビについては、再生産過程の初期の段階である産卵生態や卵・浮遊幼生の輸送、および着底初期稚貝の分布などの基礎的な初期生態が明らかになっておらず、資源変動に大きな影響を及ぼすと考えられるこの期間の動態が解明されていない。このような資源生態学的な知見が乏しい理由のひとつは、野外調査における卵、浮遊幼生および着底初期稚貝の動態や分布の構造が明らかされていないため、再生産量の定量的な評価技術が確立していないことにあった。研究課題「暖流系アワビの初期生活史における分布構造の解明（中央水研・西水研）」においては、暖流系アワビ類における卵・浮遊幼生の分散、輸送過程と着底初期稚貝の着底条件等によって規定される分布構造を明らかにし、再生産量の定量的評価技術の確立に取り組むこととした。また、暖流系アワビの初期生態に関する研究を進める上で最も大きな隘路のひとつが、分布域が重複しているが各々生態学的特徴の異なるクロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビの3種の卵、浮遊幼生および着底初期稚貝の識別が困難なことであった。またエゾアワビにおいても採集サンプルの識別に相当な労力と経験的な技術力を要しており、初期生態解明の隘路となっていた。そこで研究課題「アワビ類の初期生態解明のための種判別技術の開発（瀬戸内海水研）」において、モノクローナル抗体あるいは遺伝子解析等の生化学的手法を用い、我が国に生息するアワビ類4種について成長段階毎の的確な識別方法を開発するこ

* 中央水産研究所 〒238-0316 神奈川県横須賀市長井 6-31-1
National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Nagai 6-31-1, Yokosuka, Kanagawa 236-0316, Japan.

とした。これらの研究成果により、アワビ類の初期生態などの再生産機構に関する基礎的知見の充実が期待される。

エゾアワビについては、初期生活史において重要となる着底・変態誘起物質や初期餌料の多くが同定され、成長にともなう食性変化の機構が解明されるなど、実験室レベルでの研究が進展してきている。研究課題「エゾアワビにおける発育段階毎の減耗要因の解明（東北水研）」においては、既往成果を踏まえ、実際のフィールドにおいて餌料環境、水温等の諸条件がエゾアワビ幼生の着底・変態、着底稚貝の成長・生残等に及ぼす影響を解析し、天然生息域におけるエゾアワビの初期減耗過程を追跡することによって資源変動機構を生息環境の側面から明らかにすることとした。さらに、再生産加入量を規定する最も大きな要因の一つが親貝資源量であることは言を待たない。近年の資源量減少要因のひとつとして、長年の強い漁獲圧と不十分な資源管理により親貝が再生産に必要な密度を下回っていることが想定されており、研究課題「エゾアワビの親貝資源密度が再生産に及ぼす影響の解明（北海道立水試に委託）」においては、実際の漁場で人為的な資源添加によって親貝高密度生息域を作出し、卵・浮遊幼生・着底稚貝の発生密度と親貝資源密度との関係を明らかにした。

アワビ類資源量の安定化を図り、且つ親貝集団を人為的に形成して再生産加入量を高める上で、人工種苗放流は極めて有効な手段の一つである。しかし一方で、放流用の人工種苗は天然漁場集団と比べて遺伝的変異性が低い傾向にあり、継続的な放流による漁場への遺伝的多様性の影響が懸念される。研究課題「アワビ漁場における種苗放流の遺伝的多様性への影響評価」においては、アワビ類に適用できる変異検出感度の高いマイクロサテライトDNA（MS）分析手法を開発し、遺伝的多様性評価法としての有用性を検討しながら、種苗放流による天然漁場集団への影響評価法を開発するとともに、開発された手法を基に放流強度と漁場の遺伝的多様性との関係を明らかにした。

これらの研究の成果により、アワビ類天然資源の変動要因と、放流による資源添加の条件の一端が、今後徐々に明らかになるものと期待される。

アワビ類初期生態解明のための種判別技術の開発

浜口昌巳^{*1}・佐々木美穂^{*1}・堀井豊充^{*2}・清本節夫^{*3}・大橋智志^{*4}・藤井明彦^{*4}
・滝口直之^{*5}・橋本加奈子^{*6}・竹内泰介^{*7}

Development of a discrimination methods by using molecular and monoclonal antibodies techniques for *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life stages.

Masami HAMAGUCHI^{*1}, Miho SASAKI^{*1}, Toyomitsu HORII^{*2}, Setsuo KIYOMOTO^{*3},
Satoshi OHASHI^{*4}, Akihiko FUJII^{*4}, Naoyuki TAKIGUCHI^{*5}, Kanako HASHIMOTO^{*6}
and Taisuke TAKENOUCHI^{*7}

Abstract Three species of abalones, *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea*, are distributed along the southwest coast in Japan and are common and commercially important shellfish in the country. Survey records show a rapid decline in fisheries production of abalones in the last decade, however, few attempts have so far been made to study the early life stages of these species. One of the bottleneck problems in the study of early life stages of these species is the difficulty to discriminate between species since their morphological features are very similar. In addition, a hybrid variety of *H. discus discus*, and *H. madaka* had been reported and this fact has made the species identification problem more complex.

The purpose of this paper was to develop a discrimination method by using molecular and monoclonal antibodies techniques for *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life stages.

Molecular (PCR) techniques

To discriminate between *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea*, we analyzed some mitochondrial, 16S rDNA, COI (cytochrome c oxidase subunit I), Cyt b (cytochrome b) and nuclear genes, 18S and 28S rDNA, ITS (internally transcribed spacer), ferritin, and calmodulin-introns and discovered that PCR products related to calmodulin-intron were very suitable for species discrimination. A PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphisms) method was developed using calmodulin-introns. Fertilized eggs and planktonic larvae were analyzed by using 2 step PCR method.

2006年1月19日受理 (Received: January 19, 2006)

^{*1} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5 (National Fisheries Research Institute of Seto Inland Sea, Fisheries Agency, Maruishi 2-17-5, Hatsukaichi, Horisima 739-0452, Japan.)

^{*2} 中央水産研究所 〒238-0316 神奈川県横浜須賀市長井6-31-1 (National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Nagai 6-31-1, Yokosuka, Kanagawa 238-0316, Japan.)

^{*3} 西海区水産研究所 〒851-2213 長崎市多良良町1551-8 (Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Agency, Taira 1551-8, Nagasaki, Nagasaki 851-2213, Japan.)

^{*4} 長崎県総合水産試験場 〒851-2213 長崎市多良良町1551-4 (Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Taira 1551-4, Nagasaki, Nagasaki 851-2213, Japan.)

^{*5} 神奈川県水産技術センター 〒238-0237 三浦市三崎町城ヶ島養老子 (Kanagawa prefectural Fisheries Technology Center, Jogashima, Misaki, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan.)

^{*6} 千葉県水産総合研究センター 〒295-0024 千葉県安房郡千倉町平磯2492 (Chiba Prefectural Fisheries Research Center, Hiraiso 2492, Chikura, Chiba 295-0024, Japan.)

^{*7} 三重県科学技術振興センター水産研究部 〒517-0404 志摩市浜島町浜島3564-3 (Fisheries research division, Mie prefectural Science and Technology Promotion Center, Hamashima 3564-3, Hamashima, Mie 517-0404, Japan.)

Monoclonal antibodies techniques

Initially, we prepared monoclonal antibodies using samples of *H. discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* veliger larvae as antigens, and obtained *H. gigantea* specific monoclonal antibodies. However, we were not able to obtain monoclonal antibodies specific to *H. discus discus* and *H. madaka*. Hence, we performed a proteome analysis between *Haliotis discus discus* and *H. madaka* and discovered several species-specific antigens. Secondly, we prepared monoclonal antibodies by using these new antigens. Consequently, we obtained monoclonal antibodies specific to each abalone species. We then surveyed the immunological specificity of these antibodies by using field samples.

Future goals

Most *Haliotis* species have a planktonic larval stage. To date, little is known about the ecology of *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life-history stages. Consequently, the influence of the planktonic larval stage on recruitment variability is not well understood. Fine scale spatial and temporal resolution in sampling coupled with an understanding of hydrodynamics would greatly improve our knowledge of the ecology of these larvae. However, their identification, which is traditionally based on the observation of the size of larval shells and the pattern of shell surface sculptures under light and scanning electron microscopes, as well as the processing of large numbers of samples, remains a major hindrance to the study of marine invertebrate larval ecology. Antibody technique offers a powerful tool to study planktonic larval populations for two reasons: samples can be analyzed quickly and the method makes species identification easy. However, the method has a serious problem such as cross-reactivity of other mollusk species. On the other hand, PCR identification technique, although the most accurate, is time consuming and is very expensive. Therefore, we suggest a hybrid discrimination system, by combining PCR and monoclonal antibodies techniques to identify *Haliotis* species in their early life stages.

Key words: *H. discus discus*, *H. madaka*, *H. gigantea*, species discrimination, PCR-RFLP, monoclonal antibodies

国内のアワビ類の初期生態は、エゾアワビ *Haliotis discus hannai* については詳細に調べられており (Sasaki and Shephard, 1995 ; 佐々木, 2001), 数多くの先達やプロジェクト研究により, その産卵から加入にいたる過程はほぼ解明されているといって過言ではない。しかし, 一方で, 暖流系アワビ類については初期生態がほとんど解明されていない。その原因のひとつとしてエゾアワビが生息する海域では, 近縁の *Haliotis* 属がほとんど生息しないため, 発生初期の浮遊幼生および着底稚貝の調査において形態等が酷似する近縁種間の種判別が必要ないのに対し, 黒潮や対馬暖流の影響が強い海域では, 市場で見られるものだけでもクロアワビ *H. discus discus*, マダカアワビ *H. madaka*, メガイアワビ *H. gigantea*, トコブシ *H.*

diversicolor aquatilis, フクトコブシ *H. diversicolor diversicolor*, イボアナゴ *H. varia*, の6種があり, また, 市場に出ない種でもミミガイ *H. asinine*, マアナゴ *H. ovina*, コビトアワビ *H. jacnensis*, チリメンアナゴ *H. crebrisculpta* など様々な種が生息しており, 互いに生息場や餌を巡る競合関係にあるためである。したがって, 後者の海域でそれぞれの種の増殖を図るためには, まず種に応じたきめ細かな調査・研究を行い, 着底場所の選択等の環境選択性や餌料環境を明らかにし, それぞれに見合った増殖策を施す必要がある。これらの種について成貝であれば貝殻の形態等で容易に識別できるため, 調査や研究は可能であるが, 貝殻形態が不明瞭でかつ互いに酷似する発生初期の段階で多種にわたる暖流性アワビ類を識別するのはきわめて困難である。

Hayashi (1983) は、トコブシと、エゾアワビ、クロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビの浮遊幼生について走査電子顕微鏡による詳細な観察を行い、原殻のサイズ並びにその表面構造を観察することによってそれぞれ同定可能であることを見出した。しかし、この手法では、野外で採取した幼生を同定するために、特別な技術や多大な努力を要するため、このことが、暖流性アワビ類の初期生態を解明するための調査・研究の大きな隘路となってきた。

最近、風呂田 (2000) が提唱した幼生ネットワーク理論 (メタ個体群) に基づく海洋生物の保全、並びに持続的漁業生産をあげるための様々な方策 (浜口ら, 2005) を推進するために必要な幼生動態調査 (浜口ら, 2004) と、それによる母貝集団の特定 (日向, 戸簾, 2005) を実施するにあたって、この発生初期の同定法の問題が障害になっていると考えられる。例えば、暖流性アワビ類で浮遊幼生の出現傾向を2年間調査した例 (田中, 石田, 1983) では、卵やトロコフォア幼生を含む全卵・幼生数は年による差が小さかったものの、発育の進んだベリジャー期幼生は年による差が大きかったとしている。この原因のひとつとして、ベリジャー期に至る過程で移送 (時には無効分散) された可能性が高いと考えられるが、これを解明するためには、調査対象となる海域の海水流動、及び浮遊幼生の動態調査を行う必要がある。浮遊幼生の動態が明らかになれば、千葉県等 (柴田, 2002) で進められている母貝場の造成事業においても、“母貝をどこに配置すればよいか” が明らかとなり、効率よく再生産による資源量の増大を図ることが可能になると考えられる。

このように、暖流性アワビ類について、発育段階に応じた生活史完結型のきめ細かな資源回復策を講じるためには、発生初期の浮遊幼生並びに着底初期稚貝の迅速かつ簡便な同定法の開発が必須であるといえる。

そこで、本研究では、浜口ら (2004) が解説している発生初期の貝類の様々な種判別方法の中から、簡便で再現性の高い遺伝子解析とモノクローナル抗体を用いて同定手法を開発するとともに、完成した手法について、複数の地域で採取した幼生や稚貝を用いて分析を行い、実用化のための検証を行った。

生化学的手法による種判別技術の開発の経緯

今回の技術開発では、原 (1992) によって亜種レベル以下の関係とされているクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、(エゾアワビ) をどう識別するかが問題

となる。なかでも、クロアワビとマダカアワビ (およびエゾアワビ) については、これまでの研究 (原, 1992 ; 上島¹, 1993) により地方品種レベルとされ、場合によっては遺伝子交流の可能性が示唆されていることから、各遺伝子領域の差は小さいと考えられる。抗体を用いた判別方法は、対象となる生物の体成分に含まれる糖鎖やタンパク質の構造による差によって行い、一般に、これらの分子は遺伝子 (なかでもミトコンドリアDNA) と比較して、変異がかなり遅く比較したい対象間に差が無いことが予想されるので、前述した状況は、この手法の開発はきわめて困難であるということの意味している。

遺伝子解析による判別法の開発経緯

海洋生物でよく使われているミトコンドリアDNAの16S ribosomal RNA (以下16SrRNAとする) やcytochrome c oxidase subunit I (以下COIとする) の塩基配列を解析すると、クロアワビ、マダカアワビおよびエゾアワビの塩基置換はほとんど無く、また、適当な制限酵素サイトに塩基置換がないことから、この領域を使ってこれら3種を簡便に識別することは困難である。An *et al.* (2005) はこれら二つの領域を利用してアワビ類の系統関係を解析している。この領域を用いる限り、トコブシとクロアワビ等の関係は明らかであるが、クロアワビ、エゾアワビ、マダカアワビの関係を論じるには塩基置換数が少なく、解像度が低いので信頼性に欠けると考えられる。

そこで、本研究では、まずこれらの領域を最初に捨てて別の領域について探索を行った。しかし、アワビ類でそれら以外のミトコンドリアDNAの情報は、本プロジェクト開始時 (平成13年) にはなかった。しかし、核DNAに関しては当時でもHuang *et al.*, 1997; Metz *et al.*, 1998 ; Muchmore *et al.*, 1998 ; Evans *et al.*, 2000 ; Selvamani *et al.*, 2000 ; Sekino and Hara 2001等のミニ、マイクロサテライト (以下MSとする) の報告があり、集団解析あるいは種間比較が試みられており、これらの手法を用いると最も近縁とされるクロアワビとエゾアワビの識別も可能である (原・関野, 2002)。しかし、これらは集団マーカーであり、本研究の目指す初期生態解明のための種判別技術は個体レベルでの識別が必要となる。一方、MSによって識別可能ということは、核DNAのジャンク領域などに種判別が可能となる領域があると考えられた。そこで、核DNA上にコードされ、ポリジーンであるカルモジュリ

¹ 上島 勲, 瀬川京子, 小林敬典, 沼地健一, 1993 : ミトコンドリアDNAの制限酵素分析による *Nordotis* 属の類縁関係. 平成5年度日本海類学会講演要旨.

ンのイントロン多型について、(Corte-Real *et al.*, 1994) で報告されている方法を基に、当研究室で改変した手法によりクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、エゾアワビで比較することにした。

このように解析方法は決まったが、そこで新たな問題が生じた。現在、国内の貝類を分類するために最も有用な日本近海産貝類図鑑(奥谷, 2000)等による形態分類では、クロアワビとメガイアワビは識別可能であったが、クロアワビとマダカアワビについては実際の各地でマダカアワビとされている個体を見ると形態には相当変異があり、また、研究者によって見解が異なるなど分類は困難であった。また、近年、各地でマダカアワビは減少しており、試料の入手も困難であった。そこで、本研究では、とりあえず神奈川県で形態的特徴を基に選抜され、維持されてきたマダカアワビ種苗を“マダカアワビ”として使用することにした。ただし、この種苗が本当にマダカアワビであるかどうかは、今後、さらに検討を要すると思われる。

さて、このようにして解析する試料が決まったので、早速前述のカルモジュリンイントロンの多型を調べた。その結果、クロアワビ・マダカアワビとメガイアワビについては明瞭な差が認められ、また、クロアワビとマダカアワビにも差が見られるバンドがいくつか検出された。それぞれについてクローニングを行い、塩基配列を決定したところ、クロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、(エゾアワビ)でそれぞれ塩基置換があり、かつ、その置換の一部が制限酵素サイトとなっているものが発見された。その領域については、便宜上MDKS領域と呼ぶことにする。このMDKS領域はカルモジュリンのイントロンの一部であり、クロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、(エゾアワビ)で多少の長さの差があるものの1158–1196bp程度である。クロアワビと比較してみると、エゾアワビにこのうち5塩基、マダカアワビに7塩基、メガイアワビに11塩基置換とこの種にのみ特異的な挿入・欠損領域があることが明らかとなった。さらに、これらの置換はそれぞれ、クロアワビには制限酵素MunI、マダカアワビにはClaI、メガイアワビにはAclI、(エゾアワビにはSmaI)の認識部位があり、かつ、その部位はMDKS領域のほぼ中央部に位置しており、制限酵素処理後のバンドが確認しやすい位置であった。また、MDKS領域を標的としたPCRでは、これらのアワビ類以外の小型アワビ(ミミガイ、マアナゴ、チリメンアナゴ、イボアナゴ、トコブシ、フクトコブシ)では産物が得られなかった。

そこで、まず、MDKS領域をPCRで増幅し、産物が得られた場合、上記酵素を用いた制限酵素断片長解析(RFLP)によってクロアワビ、マダカアワビ、メガイ

アワビの識別が可能となった(Fig. 1)。この方法を用いて、共同研究者並びに協力機関である和歌山県、大分県、佐賀県から試料を採取し、解析を行ったところ、各地のアワビ類でも適用可能であることが明らかとなった。また、野外試料の一部には、形態的にもクロアワビとマダカアワビの交雑種と思われる個体が多くあり、MDKS領域による判別結果でも同様の結果が得られた。この交雑が疑われる個体の出現割合は西に行くほど高くなる傾向を示した。また、特にマダカアワビの種苗生産用親貝にはクロアワビと思われる個体が混入しており、得られた幼生がほとんどハイブリッドであると思われる場合もあった。

マダカアワビとクロアワビの関係については、(原, 1992)によると地方品種レベルであるとされており、形態的にも差異があるのでまったく同一のものではないと考えられるが、(小池ら, 1988)は暖流性アワビ類の交雑種を使って実験しており、互いに交雑可能である。これら2種の分布域は重なっているため、何らかの隔離機構が無いと互いに交雑し、種(集団)の独立性は維持できない。一般に、マダカアワビは深いところに生息していると言われており、分布水深や産卵時期を変えることによってそれぞれの集団の独立性を保ってきた可能性がある。そのため、もし仮にこのような機構で両者が棲み分けてきたならば、両者の放流場所を明確に識別して放流しないと放流効果は期待できなと考えられる。また、交雑個体は本来の種とは異なる行動・生態的特性を持つので、例えば、クロアワビとマダカアワビの交雑種を放流した場合、両種の生息場所に進出し、さらに交雑を進めることで本来のクロアワビやマダカアワビの生息場所や集団の独立性を低下させることが予想される。そこで、このような問題を

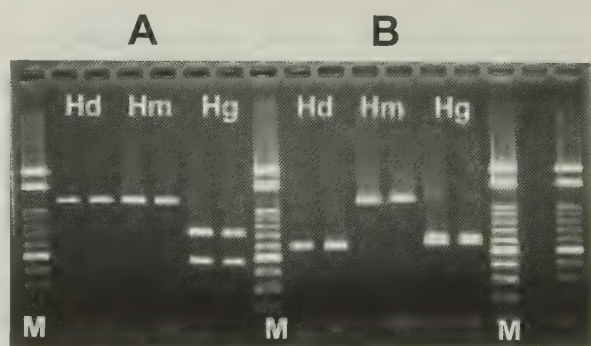


Fig. 1. Restriction fragment length polymorphisms revealed by digestion of MDKS region with restriction enzyme AclI (A) and MunI (B). Hd; *Haliotis discus discus*, Hm; *H. madaka*, Hg; *H. gigantea*, M; DNA marker (100-bp ladder).

解決するためには、親貝をしっかりと識別した後に種苗生産を行う必要があると考えた。

そこで、長崎県総合水産試験場で飼育中のクロアワビ、マダカアワビ親貝について生かしたままDNA試料を採取し、MDKS領域による識別を行った後、種苗生産を行うことが可能かどうかを検討した。すなわち、親個体について個体識別を行った後、親貝としての仕立てを行う前のクロアワビおよびマダカアワビから血リンパ球あるいは外套膜の一部を採取し、DNAを抽出してMDKS領域による識別を行い親個体とした。これらの親個体からは順調に種苗生産ができたことから、それぞれ便宜上ではあるが“純系”の幼生および稚貝を得ることが可能となった。

一方、この幼生および稚貝を用いてMDKS領域を用いた識別方法を検討したところ、浮遊幼生および着底初期稚貝では得られるDNA量が少なく、また、MDKS領域は核DNAの一部でありミトコンドリアDNAのようにコピー数が多くないことからsingle PCRでは判別が困難であることが明らかとなった。そこで、MDKS領域の検討に用いたカルモジュリンイントロンを標的としたPCRプライマーCAD-1とCAD-2を用いた2 step PCRを検討したところ、卵から着底初期稚貝までの判別が可能となり、本法は暖流性アワビ類について全生活史に適用可能な識別方法となった。

また、MDKS領域は核DNAであるために、交雑マーカーとしても機能することが期待されたが、上記の便宜上の“純系”を用いて交雑実験を行ったところ、次世代はすべてハイブリッド型、さらにその次世代はメンデルの法則とおりの出現比率となった。しかも、ク

ロアワビとマダカアワビの交雑実験を、MDKS領域を用いて識別した親貝を用いて2年間実施したところ、いずれの年も受精後の発生率が純系同士では90%を超えたのに対し、常に70%程度となりやや下がる傾向を示した。この原因については今後も検討を要するが、これらの種間の交雑は受精後の生残率を低下させる可能性があるのではないかと考えられた。アワビ類は多産型（r戦略）戦略をとるため、多くの卵や幼生を産出することが重要であるが、前述の結果から、両者の交雑もそれぞれの再生産を危うくする可能性があることが懸念される。

したがって、マダカアワビとクロアワビの生態的特徴、特に、両集団が何らかの隔離機構によって分離して成立してきたと考え、今後はその隔離機構（例えば深さによる棲み分けや産卵時期をずらす等）を解明し、それぞれに見合った場所への放流や増殖策を施す必要があると考えられる。そのためには、国内各地でクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビについて、浮遊幼生時期から3種を識別して調査を行い、それぞれの生態的特徴を明らかにする必要があると考えられる。そこで、MDKS領域による種苗生産用親貝の識別並びに幼生および着底稚貝の種判別マニュアルを添付するので、参照されたい（添付資料-1、添付資料-2）。

抗体による判別技術開発の経緯

前述のように、クロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビの浮遊幼生や着底稚貝の種判別用の抗体の作成

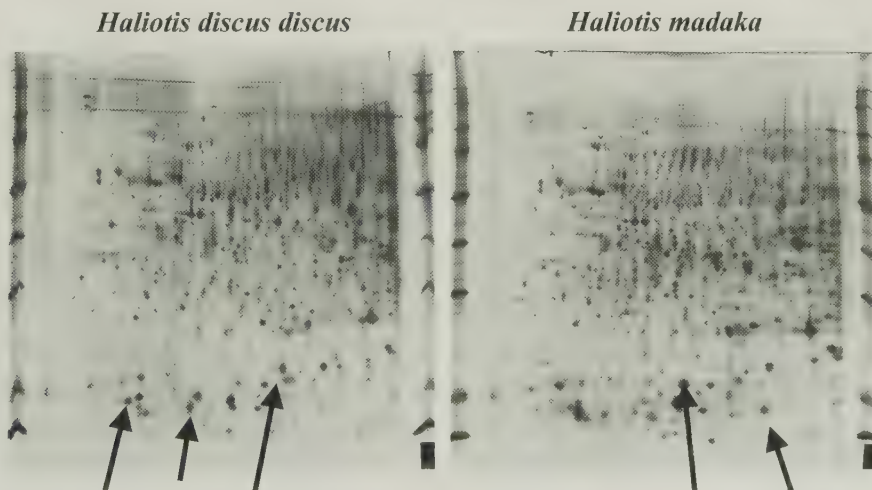


Fig. 2. Two-dementional electrophoretic patterns of veliger larvae of *Haliotis discus discus* and *H. madaka*. Arrows show the each species specific spots.

のうち、クロアワビとマダカアワビは互いに近縁であり、それぞれを識別できる抗体を作製することは困難である。したがって、今回は二次元電気泳動 (Fig. 2) を活用し、両者に特異的な抗原ならびに抗体の選別を行った。その結果、クロアワビおよびマダカアワビに特異的な抗体を作成するに至った。ただ、アワビ類幼生に抗体による識別方法を適用する場合には、幼殻の構造上の問題から、抗体を体内に浸透させるのが困難であり、二枚貝で使用されている方法をそのまま適用することはできない。この問題については第2期課題で検討しているため、第2期後には、野外で採取したアワビ類浮遊幼生の種判別を抗体で効率よく行うことが可能になる予定である。

今後の課題

MDKS領域による分析は、先にも述べたように核DNAであること、コピー数が少ないことなどから2 step PCRを余儀なくされている。この方法をより簡便にするためにはコピー数が多いミトコンドリアDNAの情報を活用すること等が考えられる。これまでに、*Haliotis*属では*H. rubra*でミトコンドリアDNAの全長解析が実施されるなど16SrRNAやCOI以外の領域の活用も可能となっている。現在、我々は、これまでに当研究室で確立した海産無脊椎動物のミトコンドリアDNA全長解析手法によって得た、ミトコンドリア全長解析結果による近縁種間の比較 (例えばYasuda *et al.*, 2006) を実施している。そこで本プロジェクト研究第2期課題では、この手法を用いてクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビ、エゾアワビについてミトコンドリアDNAの全長解析を実施し、これによって得られる情報を活用してより簡便な浮遊幼生の種判別技術を開発すると共に、ミトコンドリアDNA中の高度変異領域を活用した新たな集団解析法の開発も進めている。また、ミトコンドリアDNA全長の情報による系統解析は、情報量が多いために信頼度が高まる。そこで、これまでにミトコンドリアの一部を利用した系統解析によっても明瞭な結論が出ていないクロアワビ、マダカアワビ、エゾアワビの関係について明らかにする予定である。

また、本課題で作成したモノクローナル抗体の一部は、アワビ類幼生の卵黄や体成分を認識するため、これを活用し、アワビ類幼生1個体の卵黄タンパク質や体成分の定量分析法を確立することが可能であり、この取り組みも第2期課題で東北区水産研究所の高見主任研究官を中心として検討されている。このように本課題の成果は、アワビ類幼生並びに着底稚貝の餌料環境を評価する手法としての応用が可能となるなど種判

別以外の研究にも役立っている。

本課題で開発した二つの種判別方法によって、これまでは困難であったクロアワビ、マダカアワビ、メガイアワビの浮遊幼生が識別できるようになったことから、これらのアワビ類の産卵期に浮遊幼生の動態解明を行って、その分散・回帰機構を解明して、母貝の適正配置とその管理を行うなどの持続的生産のための戦略的な栽培漁業を行うことも可能となった。これまでアワビ類の栽培漁業は、放流種苗を採捕するという形で実施されてきたが、今後は産卵生態や初期生態に基づき、資源の再生産機構の再構築を目指す方向性で実施する必要があると考える。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり様々なご協力いただいた北海道、岩手県、宮城県、東京都、静岡県、和歌山県、大分県、愛媛県、福岡県の皆さんにお礼を申し上げる。また、貴重な試料を自ら採取していただいた沖縄県水産試験場八重山支場の久保弘文主任研究員並びに西海区水産研究所の西濱士郎主任研究官にお礼申し上げる。また、最後に本調査・研究に多大なる協力をいただいた小値賀町役場並びに小値賀漁業協同組合の諸氏には特に記して深く感謝する。

文 献

- An H. S., Jee Y. J., Min K. S., Kim B. L., and Han S. J., 2005: Phylogenetic analysis of six species of pacific abalone (*Haliotidae*) based on DNA sequences of 16s rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes. *Marine Biotechnol.*, **7**(4), 373-80.
- Evans B., White R. W., and Elliott N. G., 2000: Characterization of microsatellite loci in the Australian Blacklip abalone (*Haliotis rubra*, Leach). *Mol. Ecol.*, **9**(8), 1183-1184.
- 風呂田利夫, 2000: 内湾の貝類, 絶滅と保全—東京湾のウミナナ類衰退からの考察—. 月刊海洋号外, **20**, 74-82.
- 浜口昌巳, 佐々木美穂, 2002: 発生初期のアワビ類を判別する技術の開発. 月刊海洋, **34**(7), 517-521.
- 浜口昌巳, 粕谷智之, 日向博文, 2004b: 東京湾におけるアサリ浮遊幼生の分散. 海洋と生物, **26**, 242-250.
- 浜口昌巳, 長井敏, 安田仁奈, 2005: 新しい手法開発によるメタ個体群動態解明. 月刊海洋, **37**(2), 125-132.

- 浜口昌巳, 粕谷智之, 日向博文, 古川恵太, 2004a : 内湾・内海域におけるベントス幼生の分散・回帰 : 東京湾におけるアサリを例に. 日本プランクトン学会誌, **51**(2), 120-125.
- 原素之, 1992 : アワビの育種—アワビにおける選抜・交雑育種—. 水産育種, **18**, 1-12.
- 原素之, 関野正志, 2002 : アワビ栽培漁業におけるマイクロサテライトDNA分析の応用. 月刊海洋, **34**(7), 512-516.
- Hayashi I., 1983 : Larval shell morphology of some Japanese haliotids for the identification of their veliger larvae and early juveniles. *Venus*, **42**(1), 49-58.
- Huang B., Chai Z., Hanna P. J., and Gough K. H., 1997: Molecular sequences of two minisatellites in blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Electrophoresis*, **18**(9), 1653-1659.
- 日向博文, 戸簾幸嗣, 2005 : 東京湾におけるアサリ幼生の移流過程の数値計算. 水産総合研究センター研究報告別冊, **3**, 59-66.
- 小池康之, 孫 振興, 隆島史夫, 1988 : アワビ交雑種稚貝の摂餌と成長について. 水産増殖, **36**(3), 231-235.
- Metz E. C., Robles-Sikisaka R., and Vacquier V. D., 1998 : Nonsynonymous substitution in abalone sperm fertilization genes exceeds substitution in introns and mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**(18), 10676-81.
- Muchmore M. E., Moy G. W., Swanson W. J., and Vacquier V. D., 1998 : Direct sequencing of genomic DNA for characterization of a satellite DNA in five species of eastern Pacific abalone. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.*, **7**(1), 1-6.
- 奥谷喬司, 2001: 日本近海産貝類図鑑, 東海大学出版, 1173pp.
- 佐々木良, 2001 : エゾアワビの加入機構に関する生態学的研究. 宮城水産研報, **1**, 1-86.
- Sasaki R. and Shepherd S. A., 1995 : Larval dispersal and recruitment of *Haliotis discus hannai* and *Tegula* spp. On Miyagi coast, Japan. *Mar. Freshwater Res.*, **46**, 519-529.
- Sekino M. and Hara M., 2001 : Microsatellite DNA loci in Pacific abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol. Ecol. Notes*, **1**, 8-10.
- Selvamani M. J., Degnan S. M., Paetkau D., and Degnan B. M., 2000 : Highly polymorphic microsatellite loci in the Heron Reef population of the tropical abalone *Haliotis asinina*. *Mol. Ecol.*, **9**(8), 1184-1186.
- 田中種雄, 石田修, 1983 : アワビ浮遊幼生の出現動向について. 千葉水試研報, **41**, 1-10.
- Yasuda N., Hamaguchi M., Sasaki M., Nagai S., Saba M., and Nadaoka K., 2006 : Complete mitochondrial genome sequences for crown-of-thorns starfish *Acanthaster planci* and *Acanthaster brevispinus*. BMC Genomics (In press)

添付資料－１ 種苗生産に用いるアワビ親貝用の種判別マニュアル

用意するもの：1.5～3mLのシリンジ，滅菌したプラスチックチューブ（1.5mL），HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen 203203等)，DNeasy Tissue Kit (Qiagen 69504等)，1.5mLのプラスチックチューブが架かる卓上遠心機，0.2mLPCRチューブ，サーマルサイクラー

腹足部からシリンジで血リンパ液を採取。外套膜縁辺部 5mm 程度でも良いが，種判別は血リンパ液の方が良好な結果が得られる



採集した血リンパ液を滅菌プラスチックチューブに入れ 3000rpm 程度で遠心操作を行い，上清を捨てる。外套膜縁辺部はこの操作は必要ない。



残存した細胞あるいは外套膜縁辺部から DNeasy Tissue Kitで DNA の抽出



PCR条件

95℃ 15分間

95℃ 30秒間

65℃ 30秒間 35サイクル

72℃ 45秒間

72℃ 5 分間

HotStart Taq

Primer MDKS-1 : TCAACGAGGTAGATGCTGATGGTGAGTGC

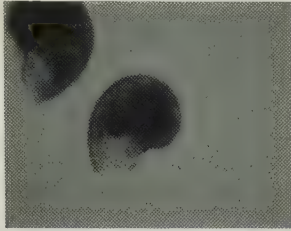
MDKS-1R : GTTGACGATATGTTGTTGCCAGCGGTTTCGA



目的に応じて制限酵素（AclI;メガイアワビのみ切断，ClaI;マダカアワビのみ切断，MunI;クロアワビとメガイアワビ両種切断）を選択し，PCR 産物に規定量を加え，それぞれの酵素に応じた温度と反応時間で処理する。その後，電気泳動を行い Fig.2 に示すバンドパターンを参照し，種判別を行う。クロアワビとマダカアワビの識別の際には，両者の交雑によって生じたと考えられる ClaI と MunI でともに切断される個体が出現するので注意を要する。

添付資料－２ アワビ類浮遊幼生および着底初期稚貝の種判別マニュアル

用意するもの：24穴マイクロプレートか滅菌したプラスチックチューブ（1.5mL）、ExTaq DNA polymerase (TaKaRa), HotStar Taq DNA polymerase (Qiagen 203203等), DNeasy Tissue Kit (Qiagen 69504等), 0.2mLPCRチューブ, サーマルサイクラー



野外で採取した試料からアワビ類幼生を取り出し、
一個体ずつ24穴マイクロプレートか滅菌プラスチック
チューブに入れる。

幼生および稚貝からDNeasy Tissue KitでDNAの抽出

PCR条件 (first step)

95℃ 1 分間

95℃ 30秒間

55℃ 30秒間 30サイクル

72℃ 45秒間

72℃ 5 分間

Ex Taq

Primer CAD-1 : CCGAATTCCAAGACATGATCAACGAGGT

CAD-2 : CCGAATTCATCTTGCGCGCCATCAT

PCR条件 (second step)

95℃ 15分間

95℃ 30秒間

65℃ 30秒間 30サイクル

72℃ 45秒間

72℃ 5 分間

HotStart Taq

Primer MDKS-1 : TCAACGAGGTAGATGCTGATGGTGAGTGC

MDKS-1R : GTTGACGATATGTTGTTGCCAGCGGTTTCGA

目的に応じて制限酵素 (AclI;メガイアワビのみ切断, ClaI;マダカアワビのみ切断, MunI;クロアワビとメガイアワビ両種切断) を選択し, PCR産物に規定量を加え, それぞれの酵素に応じた温度と反応時間で処理する。その後, 電気泳動を行いFig. 2 に示すバンドパターンを参照し, 種判別を行う。クロアワビとマダカアワビの識別の際には, 両者の交雑によって生じたと考えられるClaIとMunIでともに切断される個体が出現するので注意を要する。

相模湾沿岸でみられたアワビ類浮遊幼生と付着初期稚貝の種組成の相違

堀井豊充^{*1}・黒木洋明^{*1}・梶ヶ谷義一^{*1}・滝口直之^{*2}・浜口昌巳^{*3}

A note on differences of species composition between swimming larvae and post-larvae of abalone, *Haliotidae*, in the coast of Sagami Bay

Toyomitsu HORII^{*1}, Hiroaki KUROGI^{*1}, Yoshikazu KAJIGAYA^{*1},
Naoyuki TAKIGUCHI^{*2} and Masami HAMAGUCHI^{*3}

Abstract Four species of large-sized abalones inhabit Japan, and the three species of *Haliotis discus discus*, *H. gigantea* and *H. madaka* are distributed over the warm current region. The main distribution depths are different among these three species; *H. discus discus* is shallowest, and *H. madaka* is deepest. However, it is not clarified why habitation depth differs. We collected planktonic larvae and spat in different water depth, and the differences of the species composition were investigated. The floating larva was collected by plankton net (the caliber of 36cm, NXX13) from Dec. 2 to 8, 2003. The distribution depth of planktonic larvae changed with days, but the fixed tendency was not shown. The species composition of planktonic larva was 52% of *H. gigantea*, 38% of *H. discus discus*, 3% of *H. madaka* and 4% of hybrid of *H. discus discus* and *H. madaka*. In two investigating sites (2m and 8m depth), the spat was collected by plastic plate collectors from Dec.3 to 9, 2003. The species composition was 14% of *H. gigantea* and 72% of *H. discus discus* in shallower site, and 64% and 21% in deeper site, respectively: there was significant difference between the two sites. These result suggested that the reason that *H. discus discus* inhabits in shallower area is because the larva selects shallower area as settlement place by certain behavior.

Key words: abalone, larva, spat, species composition

我が国周辺のアワビ類資源は、1970年代以降で顕著な減少傾向にある。

一般に、幼稚仔発生量の多寡を知ること、資源の変動要因を明らかにする上で極めて重要である。しか

し、アワビ属では浮遊幼生および着底直後の初期稚貝の分布についてはエゾアワビ *Haliotis discus hannai* で一定の知見があるものの(佐々木, 2001)、暖流系に生息しているアワビ類3種(メガイアワビ *H. gigantea*,

2006年1月19日受理 (Received: January 19, 2006)

^{*1} 中央水産研究所 〒238-0316 神奈川県横浜須賀市長井6-31-1

National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Nagai 6-31-1, Yokosuka, Kanagawa 236-0316, Japan.

^{*2} 神奈川県水産技術センター 〒238-0237 三浦市三崎町城ヶ島養老子 (現神奈川県庁)

Kanagawa prefectural Fisheries Technology Center, Jogashima, Misaki, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan

^{*3} 瀬戸内海区水産研究所 〒739-0452 広島県廿日市市丸石2-17-5 National Fisheries Research Institute of Seto Inland Sea, Fisheries Agency, Maruishi 2-17-5, Hatsukaichi, Horisima 739-0452, Japan.

クロアワビ *H. disucus discus* および マダカアワビ *H. madaka*) については空間的な分布動態が明らかとなっていない。これら3種の成貝は、クロアワビが最も浅い場所に生息し、メガイ、マダカの順に深い場所に生息域を広げることが知られているが(小島, 2005), それで成長に伴う移動によるものか、または着底初期の段階から分布が異なるかは不明である。極めて重要な磯根資源でありながら、これまで初期生態に関する知見が著しく乏しかった理由としては、これまでこれら3種の浮遊幼生および稚貝の種判別が困難だったことがあげられる。

しかし、2001年から開始された独立行政法人水産総合センターのプロジェクト研究「生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発」において、遺伝子解析技術を用いてこれら3種の種判別が可能となった(浜口ら, 2006)。本報告では当該技術を野外調査に適用し、2003年12月初旬に相模湾沿岸で認められたアワビ浮遊幼生と、それに由来すると考えられる付着初期稚貝の種組成の相違に関し、いくつかの知見が得られたので報告する。

材料と方法

調査水域 調査場所は、神奈川県三浦半島西岸の相模湾沿岸に位置する長井地先とした(Fig. 1)。調査点は水深の異なる2箇所を選定し(Stn. 1: 水深8m, Stn. 2: 水深2m), Stn. 1においてプランクトンネットを用いた浮遊幼生採集を行うとともに、Stn. 1および

Stn. 2の両調査点においてコレクターを用い付着初期稚貝の採集を行った。

浮遊幼生の採集 Stn. 1において、浮遊幼生のまとまった出現が認められた2003年12月2日から12月5日までの毎日、および12月8日の計5日間で調査を行った。

各調査日とも曳網時刻は午前10時から正午の間とし、採集用のプランクトンネットとしてCMS-O型(伊東, 望岡, 2005)を用いた。曳網層は、表層、水面下3mおよび6mの3層とし、ブライドル先端から50cm前方にデプレッサ((株)離合社製 Cat.No.5577)を装着したプランクトンネットを小型調査船から目的水深まで垂下し、およそ1~2ktの速度で1分間の水平曳きを行った。曳網回数は1層あたり3回とし、濾水量は、開口部に装着した濾水計の測定値から算定した。

採集したプランクトンは直ちに実験室に持ち帰り、まず約5%のエチルアルコールを添加して攪拌した後静置し、浮遊幼生を沈殿させた。さらに沈殿物から実体顕微鏡を用いてアワビ属の浮遊幼生(佐々木, 1985)を選別し、発生段階の一つの指標として眼点の有無を確認した後、個体別にマルチプレートに収容して凍結保存した。

着底初期稚貝の採集 採集場所はFig. 1に示したStn. 1およびStn. 2の2箇所とし、採集用のコレクターとして、30cm×45cm×2mmの亚克力板を用いた。亚克力板は着底を促すために(関, 菅野, 1981), 野外水槽に2週間程度収容して自然に発生する付着珪藻を繁殖させ、さらにメガイアワビ、クロアワビおよびマダカアワビの稚貝(2cmサイズ)を7日間匍匐させた

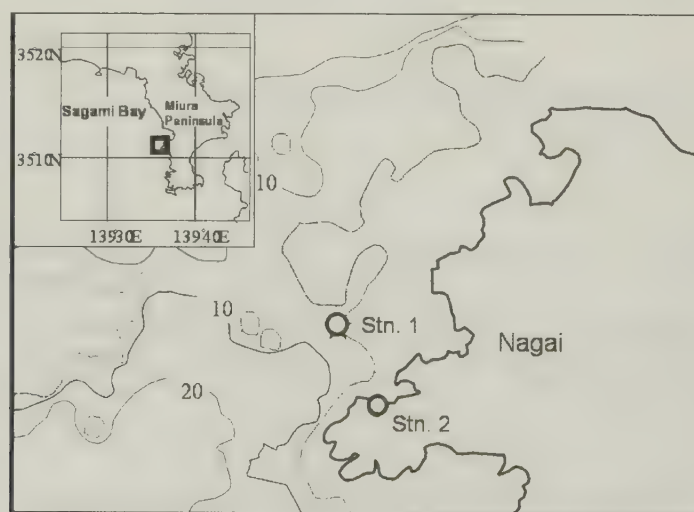


Fig. 1. Location of the research area, Nagai district, west coast of Miura peninsula. Stn. 1 and Stn. 2 are 8m and 2m depth, respectively.

ものを用いた。設置枚数はStn. 1で11枚、Stn. 2は3枚とし、2003年12月3日に設置し12月9日に回収したのから得られた初期稚貝を試料とした。これはアワビ類被面子幼生の浮遊期間が3～5日であることから(関, 菅野, 1977), 浮遊幼生を調査した期間に出現した浮遊幼生の大部分がこの期間に着底したと考えられるためである。

回収したコレクターは5%エタノール海水に約30分間漬けて初期稚貝を麻酔し、さらに刷毛で表面の付着生物を剥離した。その後海水ごと100 μ mのストレーナで濾し、ストレーナ上の残存物から実体顕微鏡を用いてアワビ属の初期稚貝を選別し、殻長を計測した後、個体別にマルチプレートに収容して凍結保存した。

種の判別 凍結保存した浮遊幼生および着底初期稚貝からDNeasy Tissue Kit (Qiagen)でDNAを抽出し、PCR-RFLPによりメガイアワビ (HG)、クロアワビ (HD)、マダカアワビ (HM) およびクロアワビとマダカアワビの天然交配個体 (HYB) の判別を浜口らの方法(浜口ら, 2006)により行った。

結 果

浮遊幼生の鉛直分布 2003年12月2日から12月8日までに合計329個体のアワビ属浮遊幼生を採集した。このうち眼点がまだ出現していない個体は122個体、既に出ていた個体は164個体で、このほかにハンドリング等により貝殻が崩壊し、眼点の有無が確認できないものが17個体あった。調査日毎の、層別の出現密度をFig. 2に示した。12月2日では大部分が眼点を有しな

い発生初期の個体で占められ、3 m層での分布密度が最も高かった。12月3日以降は大部分が既に眼点を有する個体で占められており、12月3日は表層と6 m層での分布密度が高かった。12月4日以降は全体的に分布密度が低下したが、分布密度について各水深層への偏りは生じるものの、時間の経過にともなう一定の傾向は認められなかった。

種による鉛直分布の相違 採集された329個体の種判別結果によれば、このうちメガイアワビ、クロアワビ、マダカアワビおよびHYBはそれぞれ172個体、119個体、9個体および14個体で、このほかにDNAが抽出できずに種が不明となったものが15個体あった。調査日毎の層別の種類別分布密度をFig.3に示したが、種による分布の偏りは認められなかった。

初期稚貝と浮遊幼生の種組成の相違 2003年12月3日から12月9日まで設置したコレクターに付着していた初期稚貝は、Stn. 1 (コレクター数11枚) およびStn. 2 (3枚) でそれぞれ18個体および23個体で、平均殻長は $421 \pm 58 \mu$ mであった。種判別結果によれば、Stn. 1ではメガイアワビ、クロアワビ、マダカアワビおよびHYBはそれぞれ9個体、3個体、1個体および1個体で、このほかにDNAが抽出できずに種が不明となったものが4個体あった。Stn. 2では、メガイアワビ、クロアワビ、マダカアワビおよびHYBはそれぞれ2個体、13個体、0個体および3個体で、このほかにDNAが抽出できずに種が不明となったものが5個体あった。

付着初期稚貝の種組成を浮遊幼生全体の種組成とあわせてFig. 4に示した。初期稚貝と浮遊幼生の種組成は異なり、深所のStn. 1ではメガイアワビの占める割

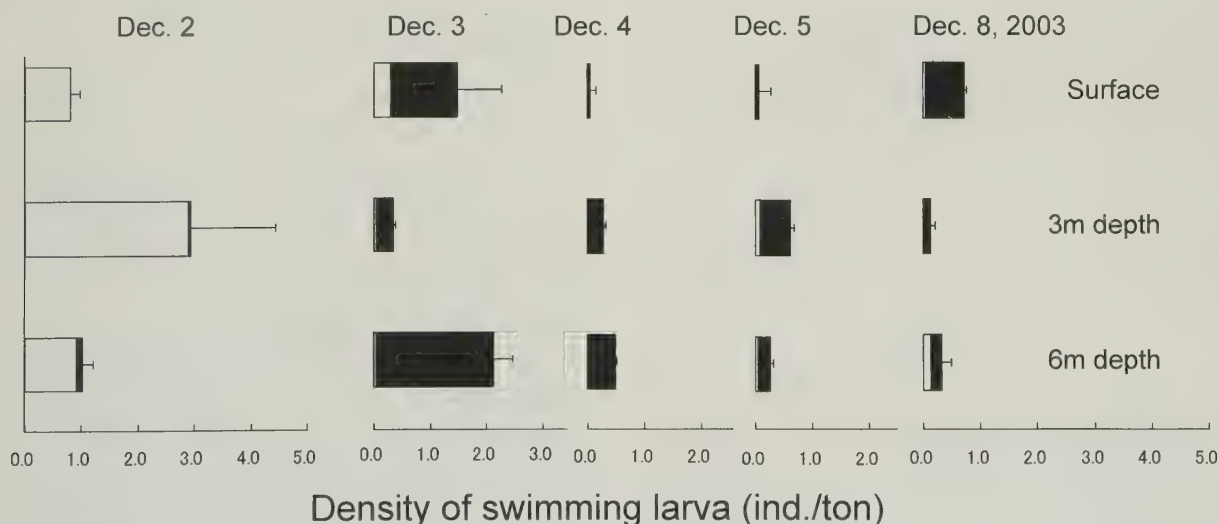


Fig. 2. Changes of vertical distribution of swimming larva of abalone, from Dec. 2 to Dec. 8, 2003, at Stn. 1 (see Fig. 1). □, not have eye spot; ■, have eye spot.

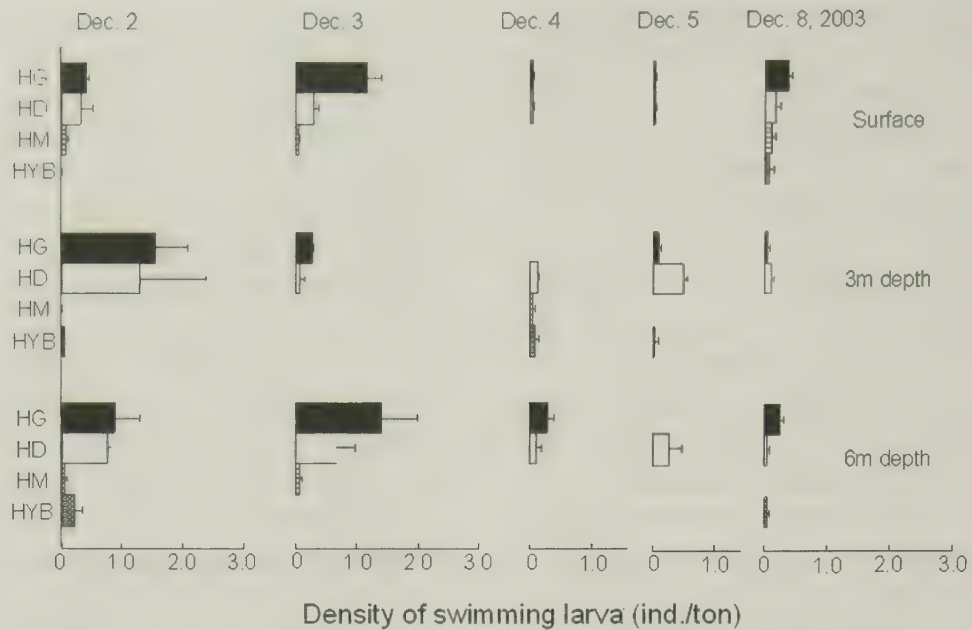


Fig. 3. Changes of vertical distribution of swimming larva of three species abalone from Dec. 2 to Dec. 8, 2003, at Stn. 1 (see Fig. 1). HG, *Haliotis gigantea*; HD, *H. discus discus*; HM, *H. madaka*; HYB, hybrid of HD and HM.

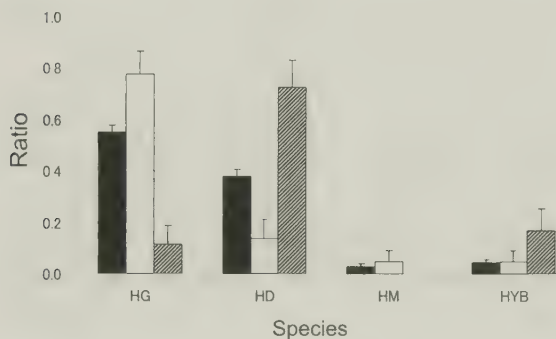


Fig. 4. Species composition of swimming larva and spat of abalone by water depth. ■, swimming larva collected at Stn. 1; □, spat at Stn. 1; ▨, spat at Stn. 2 (see Fig. 1). HG, *Haliotis gigantea*; HD, *H. discus discus*; HM, *H. madaka*; HYB, hybrid of HD and HM.

合が有意に高く、また浅所のStn. 2ではクロアワビの占める割合が有意に高かった。

考 察

アワビ類浮遊幼生の鉛直分布について、エゾアワビでは北海道天売島の水深12m地点において6m以深の中層から底層に多く出現したという報告(富田, 磯貝, 1979)があるほか、宮城県沿岸では外海域で3~10m層、岸側では海底近くの水深3~6m層に高密度分布域の形成が認められている(佐々木, 2001)。

今回の暖流系アワビ類を対象とした調査結果では、日別にみると主な分布水深層には偏りが認められるものの、調査期間を通じた一定の傾向は認められなかった。このように主な分布水深が日別に異なる理由としては、発生段階により分布水深が異なる可能性があるほか、日照や波浪等の気象条件の影響も考えられる。理由は明らかでないものの、暖流系アワビ類においてもエゾアワビと同様に各水深層に均等分布していないことが示された。浮遊幼生について、プランクトンネットを用いて分布量の定量的な評価を行う場合には、鉛直曳きまたは傾斜曳き等の各水深層を網羅できるような曳網方法を採用する必要があるだろう。

また今回の調査結果では、浮遊幼生の分布水深の偏りについて、種による相違は認められなかった。一方、マダカアワビでは光や水圧によって遊泳行動が変化し、浮遊幼生が底層にとどまる可能性が室内実験結果から示唆されている(矢野, 小川, 1977)。マダカアワビを含め、浮遊幼生の分布特性を明らかにするためには、より深い水深帯での調査が必要であろう。

さらに、浮遊幼生と着底初期稚貝の種組成には有意な相違が認められ、即ちクロアワビは浅所に、メガイアワビは深所に偏って着底する傾向が認められた。暖流系アワビ類3種の成貝の分布水深は、クロアワビ、メガイアワビ、マダカアワビの順に深くなる傾向が知られているが(猪野, 1952; 小島, 2005)、今回の調査結果から観察されたクロアワビとメガイアワビの着底水深の相違はこれらと一致した。即ち、暖流系アワビ

類において成員の分布水深が異なる理由は、浮遊幼生の着底水深が異なるためであることが示唆された。今後はマダカアワビを含めた暖流系アワビ類3種の浮遊幼生期の行動生態を明らかにし、特定的水深帯への輸送機構を明らかにする必要があると考える。

謝 辞

調査を進めるにあたり、多くのご教示を頂いた神奈川県水産技術センター今井利為博士に心より御礼申し上げます。また調査の実施にあたり長井町漁業協同組合潜水部会の各位からは多大のご協力を頂いた。記して謝意を表する。

文 献

浜口昌巳, 佐々木美穂, 堀井豊充, 清本節夫, 大橋智志, 藤井明彦, 滝口直之, 内野加奈子, 竹内泰介, 2006: アワビ類初期生態解明のための種判別技術の開発, 水研センター研報, 別冊第5号, 75-83.
猪野 峻, 1952: 邦産アワビ属の増殖に関する生物学

的研究, 東海区水研報, 5, 1-102.
伊東 宏, 望岡典隆, 2005: 沿岸域におけるメソプランクトンの採集を目的としたネットの設計, 九大農芸誌, 60(2), 179-186.
小島 博, 2005: クロアワビの資源管理に関する生態学的研究, 徳島水研報, 3, 1-119.
佐々木 良, 1985: 気仙沼湾周辺におけるエゾアワビ浮遊幼生の査定と出現, 水産増殖, 32(4), 199-206.
佐々木 良, 2001: エゾアワビの加入機構に関する生態学的研究, 宮城水産研報, 1, 1-86.
関 哲夫, 菅野 尚, 1977: エゾアワビの初期発生と水温による発生速度の制御, 東北水研報, 38, 143-153.
関 哲夫, 菅野 尚, 1981: アワビ足蹠粘液状物質によるエゾアワビ被面子幼生の着底誘起, 東北水研報, 43, 29-36.
矢野 勲, 小川良徳, 1977: 浮遊遊幼生の鉛直分布に与える光, 水温および水圧の影響, 東海区水研報, 90, 19-27.

Utility of artificial settlement collector using crustose coralline algae for sampling abalone larvae in southwestern Japan.

Setuo KIYOMOTO^{*1}, Shouichi WATANABE^{*2}, Tomosuke SUENAGA^{*3}, Hiroki YAMANAKA^{*3}, Akihiko FUJII^{*2}, Yuichi KOSHIISHI^{*4}, and Toyomitsu HORII^{*4}

Abstract To assess the utility of artificial settlement collectors in southwestern Japan, collecting trials for abalone were carried out at Hirado and Iki, northwestern Kyushu, from Oct. 2001 to Feb. 2002 using settlement plates with different algal species. Corrugated polyvinyl chloride plates were conditioned as settlement plates with four treatments: high cover (30-80%) with crustose coralline algae (H-CCA), low cover (5-40%) with crustose coralline algae (L-CCA), cover with *Myrionema* sp. (MY), and no conditioning (NC). Most of the postlarvae (440 to 1250 μ m) were collected from mid November to early December. The largest number of postlarvae were collected by H-CCA plates, followed by L-CCA and MY plates, and no postlarvae was collected by NC plates. These results suggested that the H-CCA conditioning was the most effective among the four treatments, and some conditioning of settlement collectors is necessary to optimize settlement of abalone larvae.

Key words: abalone, settlement collector, crustose coralline algae, *Myrionema*

The recruitment of marine benthic invertebrates with planktonic larvae is determined by two different factors, settlement strength of planktonic larvae and post-settlement mortality (Connell, 1985). Abalones have two planktonic larval stages, the trochophore and veliger stages, and the settlement strength of the veliger larvae is an important factor determining the recruitment as well as the post-settlement mortality of postlarval juveniles (McShane, 1995). Therefore, surveys of the settlement strength have been carried out by means of sampling postlarvae on natural boulders (Shepherd and Turner, 1985), collectors with intact settlement materials (Tomita *et al.*,

1977), or collectors with diatom plates that were pre-grazed in the laboratory by juvenile abalone (Nash *et al.*, 1995).

Many abalone postlarvae were collected in eastern Japan on natural boulders covered with crustose coralline algae (CCA) (Tanaka *et al.*, 1986; Sasaki, 2001) and intact settlement materials (Tomita *et al.*, 1977; Tanaka and Kasai, 2000), and inter-annual variations of the spawning period and the settlement strength were studied (Tanaka and Kasai, 2000; Sasaki, 2001). However, in southwestern Japan, few postlarvae were collected by intact settlement materials (Yamashita *et al.*, 1977). Although the cause for collecting few postlarvae in south-

2005年12月5日受理 (Received: December 5, 2005)

^{*1} 西海区水産研究所 〒851-2211 長崎市多良良町1551-8 (Seikai National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Taira, Nagasaki 851-2213, Japan)

^{*2} 長崎県総合水産試験場 〒851-2213 長崎市多良良町1551-4 (Nagasaki Prefectural Institute of Fisheries, Taira, Nagasaki 851-2213, Japan)

^{*3} 壱岐市鮑種苗センター 〒811-5161 長崎県壱岐市郷ノ浦町大島 (Iki Abalone Hatchery, Gonoura, Iki, Nagasaki 811-5161, Japan)

^{*4} 中央水産研究所浅海増殖部 〒238-0316 神奈川県横須賀市長井6-31-1 (Coastal Fisheries and Aquaculture Division, National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Nagai, Yokosuka, Kanagawa, 238-0316, Japan)

western Japan is unknown, whether it depended on the suitability of the substratum used or if only few larvae were present (Connell, 1985), potentially more postlarvae would be collected using more appropriately conditioned substratum.

In field observations, abalone recruits are found almost exclusively on crustose coralline algae (Shepherd and Turner, 1985; Kojima, 2005) and in laboratory experiments CCA have been shown to be one of the most effective substrate to induce larval settlement for all species of abalone (Roberts, 2001). Therefore, the object of this study is to assess the utility of artificial settlement collectors in southwestern Japan with high and low cover of CCA and *Myrionema* sp., which is used as a food item for early juvenile abalone in seed production (Yotsui, 1978a).

Materials and Methods

The artificial collector consisted of settlement plates, a plate holder, a stainless steel frame, and six sinkers, and it weighed about 18 kg (Fig. 1). The settlement plates were made of corrugated polyvinyl chloride (PVC), 35 cm × 40 cm, which is used in hatcheries as a substrate for rearing juvenile abalone. The PVC plates were conditioned with the following treatments: high cover with CCA (H-CCA), low cover with CCA (L-CCA), cover with *Myrionema* sp. (MY), and no conditioning (NC). In H-CCA, PVC plates were vertically set in holders, and maintained in a tank with flowing seawater and aeration supplied for more than three months (Fig. 2). To remove other algae or attached organisms, the surfaces of the PVC plates was cleaned once a month using a cloth. CCA spontaneously attached onto the PVC plates but they were dense at the upper part of each plate and the plates at both ends of each holder (Fig. 2). Therefore, every holder with PVC plates was turned upside down and the PVC plates at the ends were changed to the middle of each holder to attach CCA equally on PVC plates. The treatment of L-CCA was

similar to that of H-CCA, except for lower frequency of the cleaning and the lack of replacement of the PVC plates. MY treatment was done on PVC plates by introducing small plastic sheets attached with *Myrionema* sp. in advance so that natural seeding of the PVC plates occurred (Yotsui, 1978b).

The study sites were Hirado and Iki, Nagasaki Prefecture, northwestern Kyushu, Japan (Fig. 3). At Hirado, four collectors each containing four PVC plates were set from Oct. 23, 2001 to Feb. 18, 2002, and at Iki from Oct. 31, 2001 to Feb. 28, 2002. The settlement plates of each postlarval collector were composed of 1 H-CCA, 2 L-CCA, 1 NC at Hirado, and 1 L-CCA or H-CCA, 2 MY, 1 NC from Oct. 31 to Dec. 31, and 1 H-CCA, 1 L-CCA, 1 MY, 1 NC from Dec. 31 to Feb. 28 at Iki.

The collectors were pulled up and the settle-



Fig. 1. An artificial collector with three settlement plates

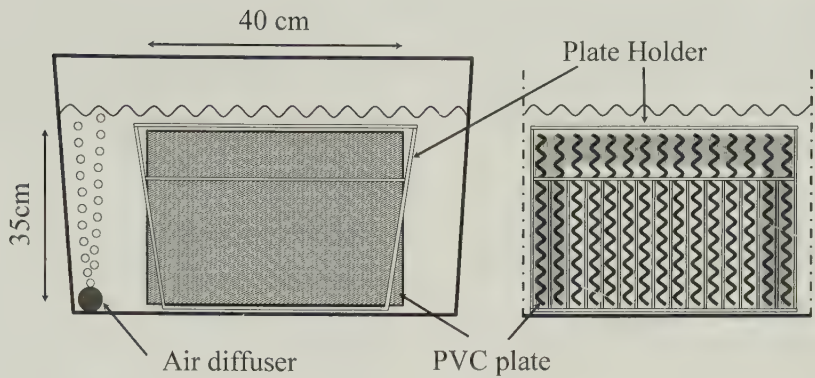


Fig. 2. Schematic drawing on crustose coralline algae conditioning of the polyvinyl chloride (PVC) plates. PVC plates were vertically set in plate holders. Hatched areas of PVC plates showed the area that CCA occurred densely.

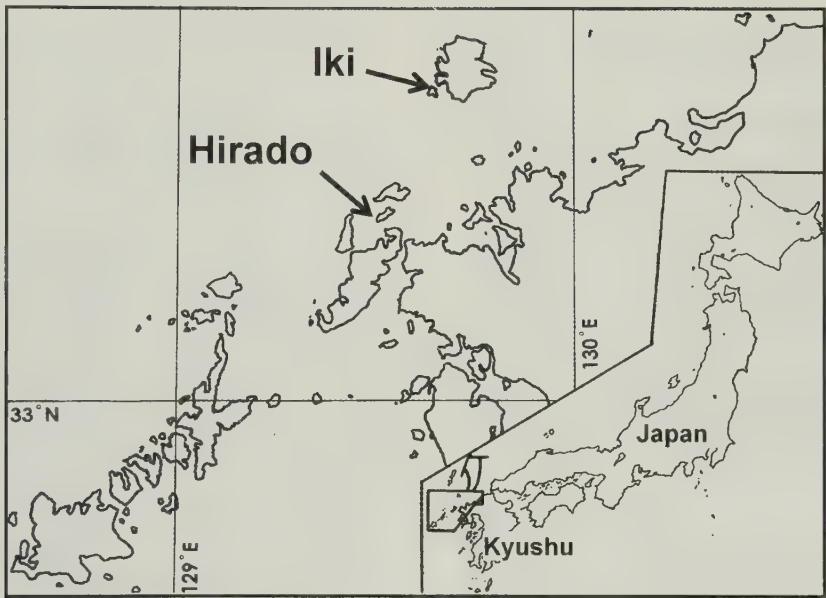


Fig. 3. Map of the study sites.

ment plates were replaced with conditioned plates from the laboratory approximately every two weeks. After treatment with 10% ethanol or freezing, organisms on the settlement plates were washed off and filtered by 100 μ m mesh net. After washing the plate, the percentage cover of CCA and *Myrionema* sp. on the each plate was visually estimated. The number of abalone was counted and the shell length was measured using an optical microscope equipped with a micrometer.

Results

The percent cover of CCA on the retrieved settlement plates was 30-80% (mean 64.1%) in H-CCA, 5-40% (13.4%) in L-CCA, 0-5% (4.0%) in MY, and 0-5% (0.5%) in NC. The percent cover of *Myrionema* sp. was 10-100% (mean 64.0%) in MY.

In Hirado, more than ten individuals of abalone postlarvae were collected on the H-CCA settlement plates during two setting terms from Nov. 9 to Dec. 8 (Table 1). During the

Table 1. Number of postlarvae on each treatment of plates at Hirado. Numbers in parenthesis are the number of plates retrieved.

Setting term	Duration (Days)	Treatment of plates		
		H-CCA	L-CCA	NC
Oct.23 - Nov. 9	17	0 (4)	0 (8)	0 (4)
Nov. 9 - Nov.20	11	12 ^a (4)	1 ^b (4)	0 ^b (4)
Nov.20 - Dec. 8	18	11 ^c (4)	2 ^d (8)	0 ^d (4)
Dec. 8 - Dec.25	17	0 (4)	1 (8)	0 (4)
Dec.25 - Jan. 7	13	0 (4)	0 (8)	0 (4)
Jan. 7 - Jan.18	11	0 (4)	0 (8)	0 (4)
Jan.18 - Feb. 2	15	0 (4)	0 (8)	0 (4)
Feb.2 - Feb.18	16	0 (4)	0 (8)	0 (4)

Significantly different between values with the following letters; a-b: $p < 0.05$, c-d: $p < 0.01$ using Tukey's method among conditions of plates at each setting term.

Table 2. Number of postlarvae on each treatment of plates at Iki. Numbers in parenthesis were the numbers of plates retrieved. -: not done.

Setting term	Duration (Days)	Treatment of plates			
		H-CCA	L-CCA	MY	NC
Oct.31 - Nov.17	17	4 (4)	- (-)	2 (8)	0 (4)
Nov.17 - Dec. 1	14	- (-)	1 (4)	1 (8)	0 (4)
Dce. 1 - Dec.17	16	- (-)	0 (4)	0 (8)	0 (4)
Dec.17 - Dec.31	14	- (-)	0 (4)	0 (8)	0 (4)
Dec.31 - Jan.12	12	0 (2)	1 (3)	0 (3)	0 (2)
Jan.12 - Jan.25	13	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
Jan.25 - Feb.13/14	19/20	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)
Feb.13/14 - Feb.28	14/15	0 (2)	0 (2)	0 (2)	0 (2)

same period, one or two postlarvae were collected on the L-CCA plates, but no postlarva was collected on the NC plates. After that, only one postlarva was collected on the L-CCA plates on Dec. 25. There were significant differences in the number of postlarvae between H-CCA and L-CCA plates ($p < 0.05$ retrieved on Nov. 20, $p < 0.01$ retrieved on Dec. 8), and between H-CCA and NC plates ($p < 0.05$, $p < 0.01$, respectively), however the numbers of postlarvae on L-CCA were not significantly different from those on NC during the same two terms. The shell lengths of postlarvae on these plates were from 440 to 1240 μm .

In Iki, the collected postlarvae were fewer than those in Hirado. The number of postlarvae collected from Oct. 31 to Nov. 17 were four on

four H-CCA plates and two on eight MY plates (Table 2). During the next setting term, from Nov. 17 to Dec. 1, the numbers of postlarvae were one on four L-CCA plates and one on eight MY plates. Since then, one postlarva was collected on L-CCA plate on Jan. 12. No postlarva was collected on NC plates throughout this survey. The shell lengths of postlarvae collected on these plates were from 450 to 1250 μm .

Discussion

In this study, abalone postlarvae were sampled from mid-November to early-December in Hirado and Iki. These results were consistent with those in Uku Island, Nagasaki Prefecture

(Ichiki *et al.*, 1977).

The numbers of collected postlarvae were different in the four conditions. In Hirado, the number of postlarvae on the H-CCA plates was significantly more than that on the L-CCA plates. In Iki, the number of postlarvae on the L-CCA plates were similar to that on the MY plates. No postlarva was collected on NC plates either at Hirado or at Iki. Therefore, H-CCA plates were most effective in collecting postlarvae among the four different treatments for plates.

One of the causes of high efficiency in H-CCA plates is considered that CCA induces settlement of abalone larvae (reviewed Roberts, 2001). Morse *et al.* (1979) showed that *Haliotis rufescens* larvae selectively settled on CCA. Shepherd and Turner (1985) showed that *H. scalaris* and *H. laevigata* larvae settled only on CCA in the field by detailed observations and experimental collections of boulders.

Diatom plates grazed by juvenile abalone are used (Suzuki *et al.*, 1987) as settlement substratum for abalone larvae in seed production systems, and also have been used as settlement substratum for abalone collectors in the field (Nash *et al.*, 1995; Horii *et al.* unpublished data). It will be needed to compare the properties of the CCA plates with the diatom plates (efficiency, time and effort for preparation, and so on) in order to determine the most suitable method.

The maximum number of collected postlarvae per square meter in eastern Japan from boulders covered with CCA on the sea bottom was 52 (Tomita *et al.*, 1977), 1800 (Tanaka *et al.*, 1986), 220 (Sasaki, 2001), and that from intact concrete blocks was 217 (Tanaka and Kasai, 2000). The numbers of postlarvae in these studies were much more than that in our study, but Tanaka and Kasai (2000) reported that marked inter-annual variations were observed in the number of collecting postlarvae. Therefore it is necessary to monitor the number of postlarvae in southwestern Japan.

The results of this study showed that abalone postlarvae could be collected using collectors

with H-CCA plates even in southwestern Japan. More research is needed to assess the suitable conditions of collectors other than settlement materials.

Acknowledgments

The authors thank Nobuhiko Maesako for his contribution towards this study. We also thank Toshimitsu Fukuhata, Katsuhiko Furukawa, Masayuki Akagi, Hirado City Fisheries Cooperative Takusima Branch, Gonoura Fisheries Cooperative and Gonoura Town Office (now Iki City Gonoura Branch) for their cooperation with this research.

References

- Connell J. H., 1985: The consequences of variation in initial settlement vs. post-settlement mortality in rocky intertidal communities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **93**, 11-45.
- Ichiki T., Yamashita K. and Tanemura K., 1977: Distribution and growth of the young abalone, *Haliotis discus* Reeve, on the coastal region of Uku Island, Nagasaki Prefecture. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish.*, **3**, 84-94.
- Kojima H., 2005: Ecological study of the population of *Haliotis discus discus* (Gastropoda, Haliotidae) for fisheries management. *Bull. Tokushima Pref. Fish. Res. Inst.*, **3**, 1-119.
- McShane P.E., 1995: Recruitment variation in abalone: its importance to fisheries management. *Mar. Freshwater Res.*, **46**, 555-570.
- Morse D.E., Hooker N., Duncan H. and Jensen L., 1979: γ -aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis. *Science*, **204**, 407-410.
- Nash W. J., Sanderson J. C., Bridley J., Dickson S. and Hislop B., 1995: Post-larval recruitment of blacklip abalone (*Haliotis rubra*) on artificial collectors in southern

- Tasmania. *Mar. Freshwater Res.*, **46**, 531-538.
- Roberts R., 2001: A review of settlement cues for larval abalone (*Haliotis* spp.). *J. Shellfish Res.*, **20**, 571-586.
- Sasaki R., 2001: Ecological studies on the recruitment structure in abalone *Haliotis discus hannai* Ino. *Miyagi Pref. Rep. Fish. Sci.*, **1**, 1-86.
- Shepherd S. A. and Turner J. A., 1985: Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*). VI. Habitat preference, abundance and predators of juveniles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **93**, 285-298.
- Suzuki H., Ioriya T., Seki T. and Aruga Y., 1987: Changes of algal community on the plastic plates used for rearing the abalone *Haliotis discus hannai*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2163-2167.
- Tanaka K., Tanaka T., Ishida O. and Ohba T., 1986: On the distribution of swimming and deposited larvae of nursery ground of abalone at the southern coast of Chiba Prefecture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **52**, 1525-1532.
- Tanaka T. and Kasai S., 2000: On grounding situation of the abalone at Chikura, Chiba Prefecture. *Bull. Chiba Pref. Fish. Exp. Sta.*, **56**, 31-33.
- Tomita K., Tajima K. and Kudo K., 1977: Morphological observation of the veliger and the creeping larvae of an abalone, *Haliotis discus hannai*, from Rebun Island in the north-western Hokkaido. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Stn.*, **19**, 13-19.
- Yamashita K., Ichiki T. and Tanemura K., 1977: Some observations of experiments on the setting behaviour of larvae of abalones, Haliotidae. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish.*, **3**, 72-78.
- Yotsui T., 1978a: *Myrionema* sp. (Phaeophyta, Chordariales), a promising food for juvenile abalone. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish.*, **4**, 65-69.
- Yotsui T., 1978b: *Myrionema* sp. (Kassou, Nagamatumo-moku) no kisetsuteki syoutyou narabini awabi syubyou seisanyo ziryo tositeno riyou (in Japanese). *The Aquiculture*, **25**, 117-120.

Delayed metamorphosis by larval abalone in the field

Hideki TAKAMI^{*1}, Hirotatsu FUKAZAWA^{*2} and Tomohiko KAWAMURA^{*2}

Abstract Delayed metamorphosis has been thought to be an important factor affecting recruitment in marine benthic invertebrates with lecithotrophic larval stages including abalone. The effects of delayed metamorphosis on larval competence, and post-larval survival and growth of Ezo abalone *Haliotis discus hannai* were examined, and age determination method for larval and newly metamorphosed post-larval *H. discus hannai* was developed by the laboratory experiments. In addition, we determined the age of field caught larvae and post-larvae, and actual larval period of *H. discus hannai* in the natural habitat was estimated.

Larval *Haliotis discus hannai* required about 4 days before becoming competent to metamorphose, and metamorphosis was successfully achieved up to 19 days after fertilization. The survival and growth rates of post-larvae that metamorphosed after a 19-day larval period, however, were significantly lower than those within less than 15-day larval period. Competent veliger larvae had a radula and regularly added rows of radular teeth with age in the absence of metamorphosis. The number of radular teeth rows increased linearly with age, but rows of radular teeth were added more slowly at lower temperatures. The effect of temperature on the development rate of the radula was quantified by the regression and the temperature coefficient, Q_{10} . From these results, an age determination method of veliger larvae and newly metamorphosed post-larvae (within a day of metamorphosis) was established; using the number of radular teeth rows.

The age of veliger larvae and newly metamorphosed post-larvae captured in the field was determined by the age determination method. Nine percent of veliger larvae were estimated to be 4-6 days old. The remaining 91% of larvae were classified as younger than 4 days old. All newly metamorphosed post-larvae were estimated to be 4-6 days old.

Key words: abalone, age determination, delayed metamorphosis, *Haliotis*, recruitment

The Ezo abalone, *Haliotis discus hannai*, is the only one species which distributes in north-east Japan and the most harvested one among the six commercially fished abalone species and subspecies in Japan. The annual catch of *H. discus hannai* was maximum about 3,200t in 1969, but then declined to current levels of less than 1,000t. The reseedling of hatchery-reared juve-

nile abalone into wild populations to enhance the stock was started in late 1970's for *H. discus hannai*, and now over 15 million juveniles are produced and released annually. Despite this, the abalone resources had not increased for many years mainly due to the low natural recruitment. In these several years, natural recruitment has markedly increased in some

2005年11月30日受理 (Received: November 30, 2005)

^{*1} Coastal Fisheries and Aquaculture Division, Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency (Shiogama, Miyagi 985-0001, Japan)

^{*2} Department of Living Marine Biological Resources, Ocean Research Institute, The University of Tokyo (Nakano, Tokyo 164-8693, Japan)

areas in Iwate and Miyagi reflecting on the increasing catch. Although understandings of the annual variation and its mechanism are important for the management of the abalone resources, their early life ecology and factors that affect the recruitment process in the field are poorly understood.

Abalone have a planktonic larval stage for dispersal. Larvae are able to delay metamorphosis in the absence of an appropriate environmental stimulus, while the capacity to metamorphose is maintained (Roberts and Lapworth, 2001). Examining the period of delayed metamorphosis in the field is important for considering about the extent to which reproduction of released hatchery-reared abalone has impacted on the genetic structure of wild populations because delayed metamorphosis has been suggested to increase the rate of mixing of geographically separated populations (e.g. Thorson, 1950; Pechenik, 1990).

In particular for species with a lecithotrophic (non-feeding) larvae including abalone, a delay of metamorphosis involves the risk of depletion of nutrients and larval senescence, and these have negative effects on post-metamorphic performance (Lucas *et al.*, 1979; Nielsen, 1981; McEdward *et al.*, 1988; Woollacott *et al.*, 1989; Pechenik and Cerulli, 1991; Pechenik *et al.*, 1993; Maldonado and Young, 1999). For instance, New Zealand abalone *Haliotis iris* larvae become competent 7 days after fertilization and can survive for a month or more at 17°C without metamorphosis under laboratory conditions (Roberts and Lapworth, 2001). Survival and growth of post-larvae were not influenced by the delay of metamorphosis within 22 days after fertilization, but post-larvae that metamorphosed after a 26-30 day larval period showed significantly lower growth and survival rates than those that metamorphosed earlier (Roberts and Lapworth, 2001). This previous findings suggest abalone larvae have a potential for longer and wider dispersal for up to several weeks. However, the effects of delayed metamorphosis on the post-larval fitness of *H. discus hannai* are not examined, and the

frequency and period of delayed metamorphosis in all abalone species in the field is unknown.

One of the approaches to estimate the duration of the larval period or extended larval period in the field is to examine morphological criteria that relate to larval age and therefore indicate evidence for delayed metamorphosis. Several planktotrophic larvae of some echinoderms (Emlet, 1986; Highsmith and Emlet,

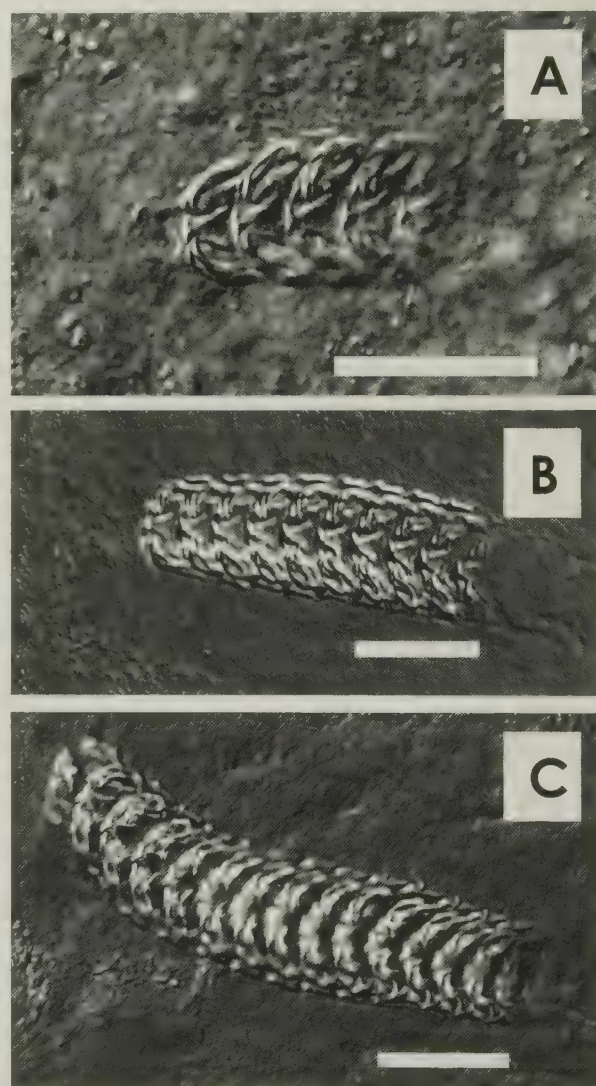


Fig. 1. Photographs of larval radula of *Haliotis discus hannai* by a differential interference contrast microscope. Scale bar = 30 μ m. (A) Radula with 5 rows of teeth of veliger larvae after 5 days from fertilization at 20°C. (B) Radula with 10 rows of teeth of veliger larvae after 6 days from fertilization at 20°C. (C) Radula with 15 rows of teeth of veliger larvae after 8 days from fertilization at 20°C.

1986; Miller and Emlet, 1999), gastropods (Pechenik, 1986), and a mussel (Bayne, 1965) change their body size or morphology after the acquisition of competence to metamorphose. If swimming larvae are found with these changes, this is used as evidence that these larvae have delayed metamorphosis. Abalone larvae show no increase in larval shell size and no obvious changes in external morphology after the acquisition of competence (Seki and Kan-no, 1977). However, larval abalone commence formation of the radula (the feeding organ of gastropods) by the acquisition of competence, and then gradually increase the number of rows of radular teeth in the absence of metamorphosis (Barlow and Truman, 1992; Roberts et al., 1999; Moss, 1999; Searcy-Bernal, 1999; Fig. 1). Therefore, if the relationship between larval age and the number of rows of radular teeth is determined, the age of field caught abalone larvae can be determined by counting the number of teeth rows.

In this article, we reviewed our recent studies on delayed metamorphosis of *H. discus hannai* (Takami et al., 2002, 2005). We examined to determine if delayed metamorphosis decreases their ability to metamorphose, or their post-metamorphic survival and growth under a laboratory condition (Exp. I). To establish an age determination method for larval and newly metamorphosed post-larval *H. discus hannai*, we investigated the relationship between age and number of rows of radular teeth by laboratory experiments under environmentally realistic temperatures (Exp. II). The age of larvae and newly metamorphosed post-larvae from field samples were determined using the age determination method established in Exp. II and we considered the extent to which *H. discus hannai* larvae delay their metamorphosis in the field (Exp. III).

Materials and Methods

1. Exp. I: Effects of delayed metamorphosis on post-larval performance

1.1 Obtaining abalone larvae

Larval abalone were hatched at the Yamagata Sea Farming Association (Yamagata, Japan) and reared with the method of Uki and Kikuchi (1984). Four days after fertilization at 20°C, the veliger larvae were transported to the Tohoku National Fisheries Research Institute (TNFRI; Miyagi, Japan) within 4 h.

1.2 Rearing experiments

Competent larvae (4 days old at 20°C) were placed into polystyrene 6 well tissue culture plates (Corning 25810-6, New York, USA) at densities of 40-60 individuals per well and maintained at 20°C in 5 mL of 0.45 μ m-filtered seawater (FSW) containing 150 μ g/mL each of penicillin G sodium and Streptomycin sulfate BP. Larvae were then induced to metamorphose at 5, 10, 15, and 19 days after fertilization by changing to the FSW containing 1 μ M γ amino-butyric acid (GABA) and the same antibiotics described above. Plates were wrapped in clear cellophane film and incubated without water change at 20°C for 2, 2, 3, and 4 days for 15, 19, 10, and 5 days old larvae, respectively; the induction of metamorphosis was stopped when the mean peristomal (adult) shell formation rate exceeded more than 50% in each larval period. A second group of larvae from the same batch were maintained at 20°C without the addition of GABA to observe spontaneous attachment and metamorphosis. Individuals that had spontaneously metamorphosed were removed when first observed.

Larval settlement was quantified for each larval age by inspecting the floor and walls of the assay chamber with inverted and dissecting microscopes. We calculated the percentage of live animals showing: (a) "shell formation" (velum shed, peristomal shell visible); (b) "metamorphosis" (velum shed, with or without peristomal shell formation); (c) "attachment" (metamorphosed or attached by the foot). The percentage of individuals showing shell formation, metamorphosis and attachment were measured (6 replicates in each larval period) daily. Spontaneous attachment and

metamorphosis were observed (12 replicates) every other day using the larvae that were not induced to metamorphose by GABA.

After the induction of metamorphosis, non-metamorphosed larvae were removed, and seawater was replaced with 5 mL of FSW per replicate containing the same antibiotic cocktail described above. Metamorphosed individuals were fed on a benthic diatom *Cylindrotheca closterium*. This diatom species is a suitable food for post-larval growth of *H. discus hannai* from just after metamorphosis (Kawamura and Takami, 1995). The added food was always present in excess. Post-larvae were also reared in a starved treatment under which individuals were not provided with any food. All experiments were run with 6 replicates (initial density was 30-50 individuals per replicate). The water was changed at 2-day-intervals. Individuals were reared for 15-23 days after metamorphosis.

Post-larval survival was monitored daily. The dead post-larvae were removed at every observations. Here, we defined dead animals as those with no heart beat during 10 seconds of observation (Takami *et al.*, 2000). The shell length of 10 live individuals selected randomly from each replicate was measured on the day of metamorphosis and at 6 days after metamorphosis using a monitor and video camera system with an image analyzer, connected to an inverted optical microscope.

2. Exp. II: Development of Age determination method

2.1 Obtaining oocytes

Larval *H. discus hannai* were produced by five different females (Batch I-V) in the TNFRI. Female abalone used in Batch I and IV, which had been cultured from eggs in aquaria, were obtained from Hirota Fisheries Cooperative, Iwate prefecture, Japan in June 2001 and April 2002, respectively. Wild female abalone were collected in October 2003 (used in Batches II and III) and October 2004 (Batch V) at the study site where the post-larvae were sampled in the field study (Exp. III). All animals were transported to TNFRI and kept in 518 liter plastic tanks until spawning induction.

Female characteristics such as the origin, the size, and the stage of gonad development defined by Kikuchi and Uki (1974) varied among the five females (Table 1). Females were induced to spawn by using a combination of the desiccation and the UV irradiation methods (Uki and Kikuchi, 1984) at 20°C on 14 June 2004 (Batch I and II), 2 July 2004 (Batch III), 30 August 2004 (Batch IV), and 23 May 2005 (Batch V). Eggs from individual females were fertilized by pooled sperm from 2-4 males in 15 L plastic containers. Different males were used for production of each batch, but the origin of these males was not recorded.

2.2 Rearing experiments

Fertilized oocytes of Batches I-V were incu-

Table 1. Female characteristics of abalone *Haliotis discus hannai* used for the experiments

Batch	Origin	Shell length (mm)	Whole body wet weight (g)	Stage of gonad development
I	cultured	77.7	54.9	mature ^a
II	wild	94.7	102.9	mature
III	wild	114.6	192.9	fully mature ^b
IV	cultured	83.1	85.6	fully mature
V	wild	91.4	98.7	mature

^aMature : individuals have developing gonad and some individuals react to spawning induction.

^bFully mature : gonad maturation is complete and spawning induction occurs at reliably high rate

bated at $20.0\pm0.3^{\circ}\text{C}$ (set point $\pm$ range) during the experimental period. At 20 h after fertilization, hatched larvae were siphoned from the plastic containers into 500 mL glass jars with 400mL of FSW at a density of < 1 larva mL^{-1} . After the completion of larval shell formation, swimming larvae were gently sieved onto a 100 μm nylon mesh and transferred each day to new jars with 400mL of FSW to avoid contamination of the cultures. Veliger larvae (3-9 days after fertilization) were used for radula observations. Veligers from each batch were randomly selected every day and preserved in 5% (v/v) seawater formalin for the radular measurement.

To test the effect of rearing temperature on the development rate of the larval radula, a part of the oocytes from Batch III and V were divided into two other temperature treatments just after fertilization and were incubated at 17.0 ± 0.3 and $22.0\pm0.4^{\circ}\text{C}$. The range of the experimental temperatures is environmentally relevant during the reproductive season of *H. discus hannai* in their natural habitat (from September to October) in Miyagi Prefecture coastal waters. The temperature of 20°C at which eggs were fertilized was elevated or dropped gradually to each experimental tem-

perature within four hours after fertilization to avoid any effects of temperature shock, and these temperature changes did not affect larval activity. Larvae at each temperature treatment were reared and sampled as described above.

To compare the radular development of metamorphosed post-larvae with that of veliger larvae, a subsample of 4-day-old veligers from Batch IV and V were transferred to a 50mL polystyrene dish with a piece (ca. 1 cm^2) of crustose coralline alga (CCA) *Lithophyllum yessoense*, which strongly induces larval metamorphosis of abalone (Takami *et al.*, 1997), and they were incubated at 20°C . More than 10 metamorphosed post-larvae, which had shed the velum (swimming organ) and some specimens which had begun peristomal shell (adult shell) formation, were randomly selected and removed from the CCA pieces every day for over 4 (Batch IV) or 3 (Batch V) days following the induction of metamorphosis. The shell length was measured after the method used in Exp. II, and then the post-larvae were preserved in 5% seawater formalin for the radular measurement. The larval shell length of 4 and 7 or 8 day old veligers ($n=7-11$) from Batch IV and V were also measured.

Table 2. Number of radulae measured in the laboratory experiments

Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Stage	Batch	Days after fertilization						
			3	4	5	6	7	8	9
17	Veliger	III	-	10	19	25	20	17	-
		V	-	10	22	20	10	-	-
20	Veliger	I	-	18	18	23	11	19	12
		II	-	30	17	18	-	14	7
		III	-	18	20	25	5	19	-
		IV	-	12	14	22	22	12	-
		V	-	24	29	10	32	-	-
	Post-larva	IV	-	-	15	10	13	11	-
		V	-	-	12	14	13	-	-
22	Veliger	III	10	34	14	28	8	10	-
		V	20	22	10	18	27	-	-

- : not determined

2.3 Radula measurement

Radular measurement was conducted using the method of Tong and Moss (1992). The larval or post-larval shells of fixed samples were decalcified in 2 N of hydrochloric acid for several minutes. The remaining tissues were cleared in 2 N of potassium hydroxide for several minutes, and then squashed on a microscope slide glass with a coverslip. The number of rows composed of fully formed rachidian, lateral, and marginal teeth on the radula was counted using a light microscope with a Nomarski interference contrast system. One to three additional rows composed of developing teeth were not included in the counts. The sample size of radula measurement in the laboratory experiments is presented in Table 2.

3. Exp. III: Age determination of field caught larvae and post-larvae

Plankton sampling was conducted at 1-7 day intervals from late August to early October in 2003 and 2004 at the mouth of Kesenuma Bay, Miyagi Prefecture, Japan (141°36'E, 38°49'N). Plankton samples were taken with an XX13 Kitahara quantitative plankton net following the method of Sasaki and Shepherd (1995). At each sampling time, hauls of the net were made from 10m depth to the surface, giving a volume of water sampled of 0.4m³ on each haul. Collected organisms were preserved in 5% seawater formalin for laboratory sorting.

Completion of the larval shell and appearance of the eye spot of the field caught larvae were determined before the radula observation. The timing and order of these developmental features have been well documented at different rearing temperatures by Seki and Kan-no (1977, Table 3). These developmental features were also used for morphological criteria to determine the age of field caught larvae.

The sampling of newly metamorphosed post-larvae, which had not acquired a peristomal shell and most of which were appear to be a day within metamorphosis, was conducted from late September to early October in 2003 and 2004 at the Myojinsaki, Miyagi prefecture, Japan (141°34'E, 38°48'N), which is 3 km distance from the sampling site of larvae. In 2003, after large numbers of larvae were observed in the plankton sampling on 25 September, newly metamorphosed post-larval abalone were collected by post-larval collectors consisting of 102 scallop shells (approx. 11cm in shell length each) covered with CCA on their surfaces. Twenty collectors were set on the bottom of the study site at depths of 5-12 m between 26 and 29 September 2003. The bottom at this site is composed of boulders with irregular shapes, mostly with a greater diameter of 20-50cm resting on the bedrock. The surfaces of these boulders and bedrock were covered with CCA. On 2 October 2003 (3 days after the recovery of the collectors) newly metamorphosed abalone in the study site were also sampled by collecting 127

Table 3. Elapsed hours or days from fertilization to the occurrence of each developmental event in larval abalone *Haliotis descus hannai* at different rearing temperatures

Temp. (°C)	^a Completion of larval shell (hours)	^a Appearance of eye spot (hours)	Formation of radulae with 10 rows of teeth (days)
17	41	59	8
18	38	54	-
19	35	49	-
20	31	45	6
21	30	42	-
22	27	39	5

^aValues were obtained by digitizing the figure 2 in Seki and Kan-no(1977).
- : not determined

boulders from the site of the post-larval collectors at which the largest settlement was observed. In 2004, we could not conduct the collector sampling because of constantly rough conditions at the study site, and newly metamorphosed abalone were only sampled by collecting 113 boulders on 17 September and 159 boulders on 8 October at the same sampling site as used in 2003.

The collectors and boulders were soaked in a 10% (v/v) solution of ethanol in seawater for a minimum of 5 min, and then brushed with a soft brush, just after retrieval on the boat. Of the organisms collected from the surfaces, post-larval abalone were sampled and these shell length was measured using a dissecting microscope in the laboratory. They were then preserved in 5 % seawater formalin for the radula measurement.

Seawater temperatures were recorded every 10 minutes between August and October in 2003 and 2004 with a battery-powered sensor (Alec Electronics, MDS-Mk V) deployed at 7 m depth at the site where post-larvae were collected.

4. Data analysis

The data from Exp. I were compared by analysis of variance (ANOVA) with Tukey-Kramer multiple comparison tests. If the assumption of homoscedasticity was rejected by Levene's test or the assumption of normality rejected by the Shapiro-Wilk W test, data were analyzed with the Steel-Dwass non-parametric multiple comparison test following Kruskal-Wallis non-parametric ANOVA. The relationship between age (days after fertilization) and the number of rows of teeth of larvae in Exp. II was evaluated using a least squares linear regression. Differences in the slope and intercept of regression lines among batches in each temperature treatments were tested using analysis of covariance (ANCOVA) by age as the covariate. The regression lines of radular development with age were also compared between veliger larvae and post-larvae with different batches (IV and V) using two-way ANCOVA

(growth stage and batch as independent variable, age as covariate). The differences of the mean larval shell length between 4 and 7 (Batch V) or 4 and 8 (Batch IV) days after fertilization were tested by student's t-test. At 5 days after fertilization, the mean numbers of rows among veliger larvae, post-larvae with peristomal shell, and post-larvae without peristomal shell were compared using two-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison test. We also tested the homoscedasticity assumption of residuals and assessed the assumption of normality as described above. The results of these statistical tests were noted only when the assumptions were violated.

The sensitivity of the development rate of the radula to changes in temperature was described by the Q_{10} coefficient, which gives the relative change in physiological rate over a specified 10 °C change in temperature (Schmidt-Nielsen, 1991). The slopes of the regression lines of pooled batches for each temperature treatment were used to calculate the Q_{10} values for the temperature ranges 17-20 and 20-22°C using the following equation.

$$Q_{10} = (R_2/R_1)^{10/(t_2-t_1)}$$

where R_1 and R_2 are the development rates of radula at temperatures t_1 and t_2 in °C, respectively. To estimate larval age by the number of teeth rows, a linear equation for $x = (y - a)/b$ (x : age of larvae, y : number of rows) at the field temperature was estimated. The intercept (a) was obtained by interpolating between the intercepts of regression lines at different temperatures based on the laboratory experiments. The development rate of the radula (b) was calculated by rearranging the equation for Q_{10} and solving for the development rate R_2 ($=b$). For example, when the field temperature t_2 is 19.3 °C, the development rate of a field caught larva R_2 is obtained by solving the following equation.

$$2.46 = (R_2/2.35)^{10/(19.3-17)}$$

Table 4. Parameters of the linear regression ($y=a+bx$) fitted to the number of rows of radular teeth (y) in response to age (x in days following fertilization) and Q_{10} values among the different batches and rearing temperatures

Temp. (°C)	Stage	Batch	<i>a</i>	<i>b</i>	Q_{10}	<i>n</i>	r^2	<i>F</i>
17	Veliger	III	-8.70	2.31	2.46	91	0.94	1477
		V	-9.49	2.43		62	0.81	256
		Pooled	-9.00	2.35		153	0.91	1461
20	Veliger	I	-9.78	3.12	2.46	101	0.94	1586
		II	-9.56	3.04		86	0.94	1265
		III	-9.67	3.06		87	0.93	1167
		IV	-9.17	3.02		82	0.91	801
		V	-10.07	3.18		95	0.92	1020
		Pooled	-9.66	3.08		451	0.93	6205
22	Veliger	III	-8.01	3.25	1.41	104	0.95	1959
		V	-8.01	3.33		97	0.94	1657
		Pooled	-8.00	3.30		201	0.95	3602
20	Post-larva	IV	-7.96	3.20		49	0.96	1012
		V	-10.59	3.66		39	0.91	382

The regressions were highly significant fore all batches in all temperature treatments ($p<0.0001$). Q_{10} was determined for each temperature interval using slopes (b) of pooled regression lines.

where 2.46 is the Q_{10} value between 17 and 20 °C, and 2.35 is the development rate of the radula (slope of pooled regression line) at 17 °C (see Results 2.1 and Table 4). The intercept a is obtained by interpolation between -9.00 at 17 °C and -9.66 at 20°C (Table 4). Thus the linear equation at 19.3°C is $x=(y+9.51)/2.89$. The age of a field caught larva (x) could be calculated by substituting the number of rows for y .

Results

1. Exp. I: Effects of delayed metamorphosis on post-larval performance

1.1 Relationship between duration of larval period and metamorphic competence

Attachment and metamorphosis increased with time in all experimental treatments. More rapid attachment, metamorphosis, and shell growth were observed in older larvae. The percentage of metamorphosed individuals 2 days

after the addition of GABA increased with the length of larval swimming period (Fig. 2); the significant results were limited to 15 d (96%) and 19 d (99%) > 10 d (51%) > 5 d (19%) (Steel-Dwass multiple comparison test, $p<0.05$). The percentage of post-larvae that attached and metamorphosed spontaneously increased rapidly after 17 days from fertilization (Kruskal-Wallis test, $p<0.05$) and reached $96 \pm 3.0\%$ metamorphosis at 24 days post-fertilization (Fig. 3). No dead un-metamorphosed larvae were observed in any experimental treatment.

1.2 Effect of delayed metamorphosis on post-larval survival

Survival rates of fed post-larvae depended on larval swimming period. For larvae that swam for ≤ 15 days, more than 80% of post-larvae survived for 20 days after metamorphosis (Day 20). There were no significant differences between individuals from 5, 10, and 15-day-old larvae in survival rates on Day 20 (Steel-Dwass multiple comparison test, $p>0.05$). In contrast,

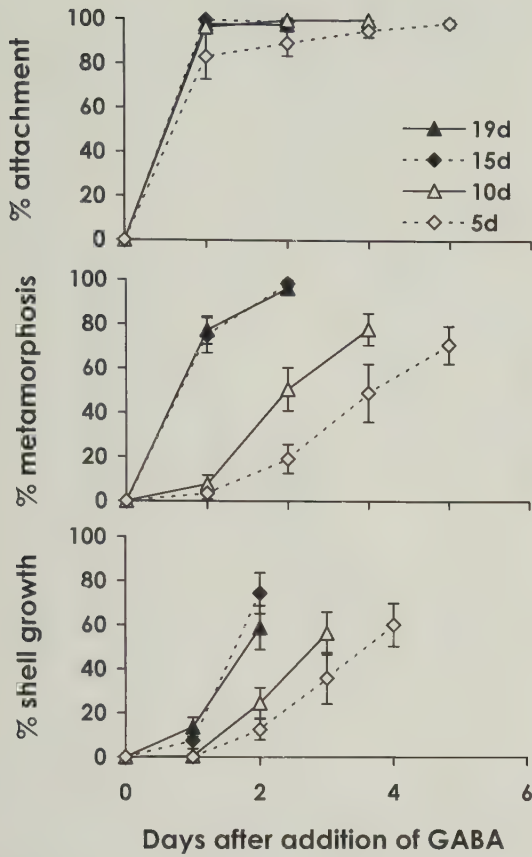


Fig. 2. The effect of GABA on attachment, metamorphosis, and shell growth with respect to 4 different larval periods (5 d, 10d, 15d post-fertilization) in *Haliotis discus hannai*. The percentage of responders in each of 12 replicates was determined at each larval period, and the mean percentage ($\pm$ SE) was plotted against days after addition of GABA.

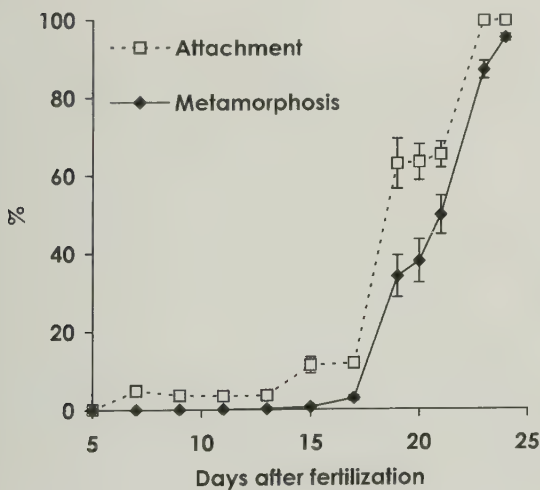


Fig. 3. The percentage of spontaneous attachment and metamorphosis in *Haliotis discus hannai*. Symbols indicate the mean percentage ($\pm$ SE) of responders in 6 replicates.

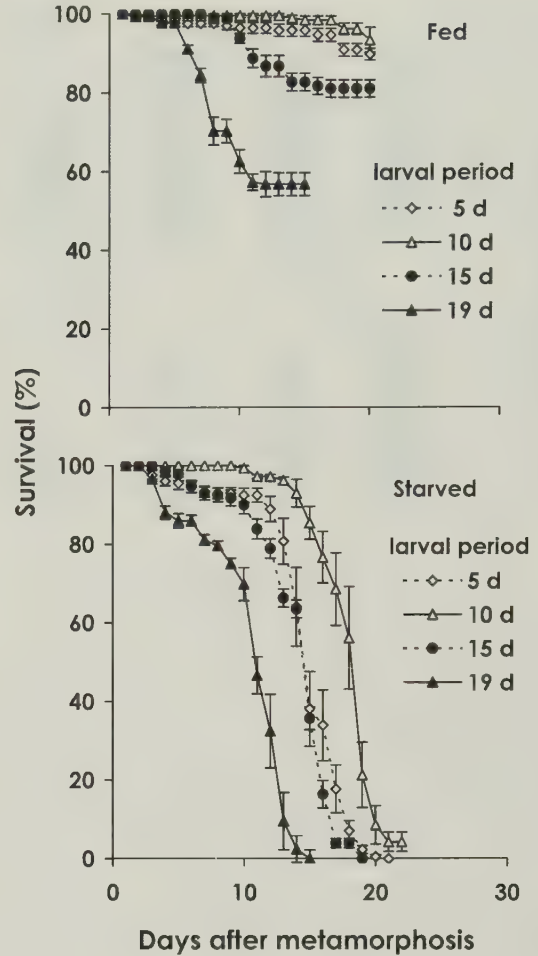


Fig. 4. Effect of delayed metamorphosis on post-larval survival rate in fed and starved post-larval *Haliotis discus hannai*. Each curve traces the survival of larvae of a particular age. Data are mean percentage ($\pm$ SE) of survivors in 6 replicates.

for individuals from 19-day-old larvae, survival was markedly reduced after Day 6, with $57 \pm 2.9\%$ of post-larvae surviving during the 15-day-observation-period (Fig. 4). In the starved treatment, survival again decreased more rapidly in older larvae, with the exception that survival rate of post-larvae from 5-day-old larvae decreased more rapidly than that of individuals from 10-day-old larvae (Fig. 4).

1.3 Effect of delayed metamorphosis on post-larval growth

Post-larval growth rates (during 6 days from the end of metamorphosis induction) did not differ significantly for larval swimming

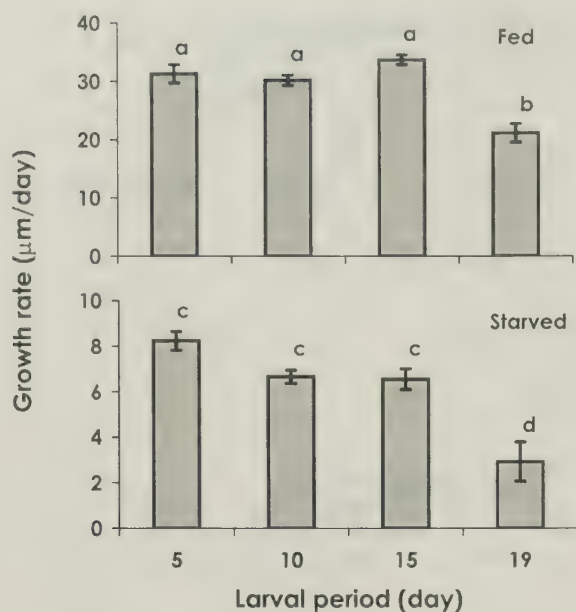


Fig. 5. Effects of delayed metamorphosis on post-larval growth rate in fed and starved post-larval *Haliotis discus hannai*. Each bar represents the mean shell growth rate ($\pm$ SE) in 6 replicates. The mean shell growth rate of each replicate was calculated using the shell length of 10 randomly selected live individuals both just after metamorphosed and 6 days after metamorphosis. Letters on the top of each column indicate the results of ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison tests, columns with different letters represent means that are statistically different ($p < 0.05$).

periods ≤ 15 days in fed treatments (Tukey-Kramer multiple comparison test, $p > 0.05$). However, growth rate of post-larvae from 19-day-old larvae was significantly lower than that of larvae ≤ 15 days old (Tukey-Kramer multiple comparison test, $p < 0.05$) (Fig. 5). In the starved treatments, post-larvae from all larval periods showed shell growth. The growth rate of individuals from 19-day-old larvae was significantly lower than those of other post-larvae (Tukey-Kramer multiple comparison test, $p < 0.05$) (Fig. 5).

2. Exp. II: Development of Age determination method

2.1 Relationship between radular development and age

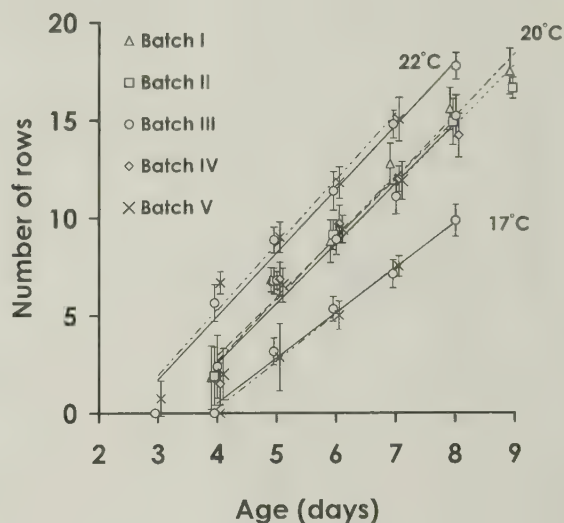


Fig. 6. Relationships of the number of rows of radular teeth and age (days after fertilization) at 17, 20, 22 °C for larval *Haliotis discus hannai* (mean $\pm$ SD). Larvae were obtained by fertilizing the eggs from two (17 and 22 °C; Batches III and V) or five (20 °C; Batches I-V) different females. Sample sizes of each point are presented in Table 2.

The number of rows of radular teeth increased linearly with age in all batches in each temperature treatment (Fig. 6). No radulae could be found from ≤ 2 day old larvae by the microscope observation in all temperatures. In 22°C, 33.3% larvae ($n = 10$) had radulae with 1-3 rows of teeth but no individual had a radula in other temperatures at 3 days after fertilization. All larvae had radulae from 5, 5, and 4 days after fertilization in 17, 20, and 22 °C temperatures, respectively. Each row of radula was composed of one rachidian tooth, two pairs of lateral teeth and one pair of marginal teeth, although the lateral and marginal teeth were not differentiated clearly (Fig. 1).

Residuals of regression lines between number of rows and age in some treatments were not normally distributed (Shapiro-Wilkes test, $p < 0.01$). The Levene's test showed that the

residuals among different batches in each temperature had homogenous variances ($p > 0.05$). ANCOVA is robust to violation of the normality assumption when the assumption of homoscedasticity is met. Hence, ANCOVA analyses were performed on non-transformed data. The regression lines were parallel (17°C : $F_{1,149}=0.75$, $p=0.39$, 20°C : $F_{4,441}=0.45$, $p=0.78$, 22°C : $F_{1,201}=0.28$, $p=0.60$), and intercepts were not significantly different (17°C : $F_{1,150}=0.29$, $p=0.59$, 20°C : $F_{4,445}=1.41$, $p=0.23$, 22°C : $F_{1,202}=3.61$, $p=0.06$) among different batches when larvae reared at the same temperature (Fig. 6, Table 4).

The comparison of regression lines among different temperatures by ANCOVA could not be performed because residuals violated both normality and homoscedasticity. These assumptions could not be met for the transformed data. Therefore, the results of temperature response should be interpreted with caution. The slopes of regression lines in the lower temperature treatments have clearly smaller slopes (Fig. 6); pooled regression lines showed that the rows of radular teeth were added more slowly at lower temperatures; 2.35, 3.08, and 3.30 rows day^{-1} were added at 17, 20, and 22°C , respectively (Table 4).

2.2 Growth and radular development of newly metamorphosed post-larvae

One day after the metamorphosis induction (incubation with CCA pieces), about 80% of larvae had metamorphosed into post-larvae and 55.6% of post-larvae had acquired a peristomal shell. Two days after the metamorphosis induction, most post-larvae showed peristomal shell growth. In batch IV, post-larvae grew to $429.0 \pm 8.8 \mu\text{m}$ (mean $\pm$ SD, $n=12$) in shell length from $284.2 \pm 6.8 \mu\text{m}$ shell length ($n=7$) of the larval shell (4 day old veligers) during 4 days of incubation (growth rate: $36.20 \mu\text{m}/\text{day}$) (Fig. 7A). The mean larval shell length ($283.9 \pm 5.8 \mu\text{m}$, $n=11$) of 8 day old veligers, which were not induced to metamorphose, was not significantly different from that of 4 day old veligers (Student's t test, $p > 0.93$, Fig. 7A). In

Batch V, post-larvae showed comparable growth in shell length with those of Batch IV (growth rate: $32.37 \mu\text{m}/\text{day}$) (Fig. 7A). The mean larval shell length ($283.8 \pm 3.2 \mu\text{m}$, $n=7$) of 7 day old veligers was not significantly different from that of 4 day old veligers (Student's t test, $p > 0.39$, Fig. 7A).

The number of rows of post-larval radula was larger than that of veliger larval radula (two-way ANCOVA, $F_{1,261}=261.95$, $p < 0.0001$, Fig. 7B). There was no significant difference in radular development between two batches (two-way ANCOVA, $F_{1,261}=0.20$, $p=0.65$, Fig.

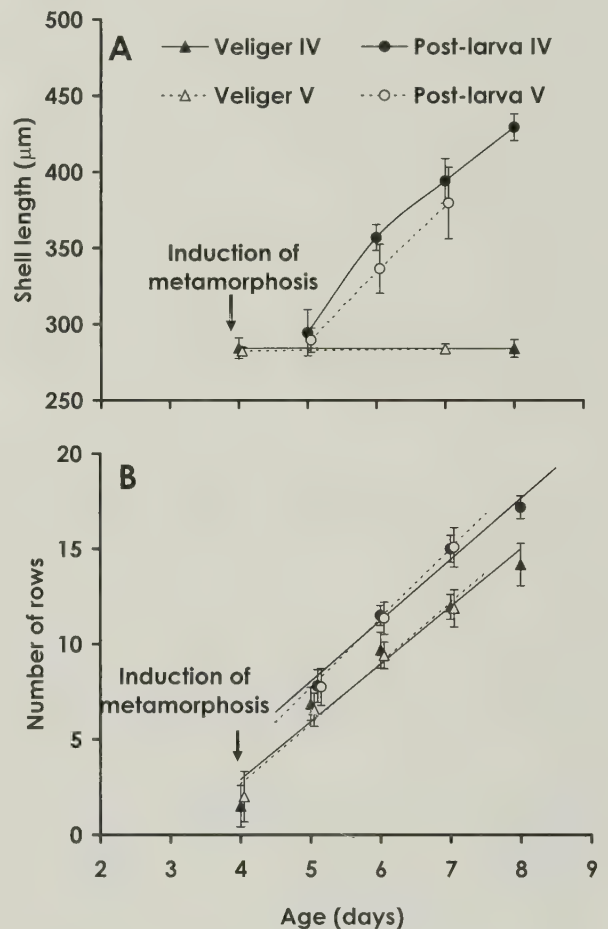


Fig. 7. Growth of shell length (A) and increase in the number of rows of radular teeth (B) with age (days after fertilization) at 20°C for larval and post-larval *Haliotis discus hannai* (mean $\pm$ SD) obtained from different females (Batches IV and V). Post-larvae were induced to metamorphose by the addition of a piece of crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense* at 4 days after fertilization. Sample sizes at each point are presented in the Table 2.

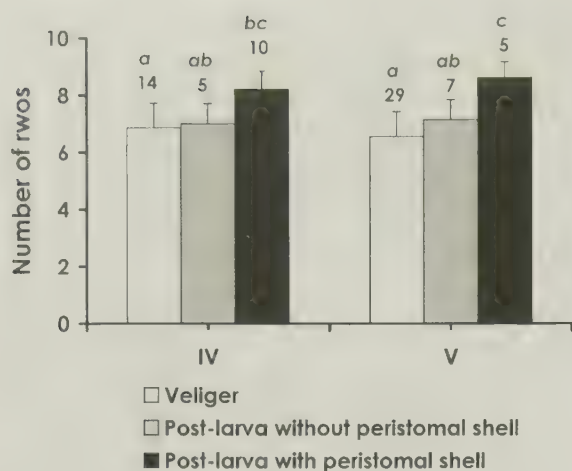


Fig. 8. Number of rows of radular teeth in veliger larva, post-larva without peristomal shell, and post-larva with peristomal shell of *Haliotis discus hannai* between different females (Batches IV and V). All individuals were 5 days after fertilization and both post-larvae were one day from induction of metamorphosis by a piece of crustose coralline alga *Lithophyllum yessoense*. Each bar represents the mean number of rows (+SD) with the number of individuals measured indicated above each bar. Alpha letters on the top of each bar indicate the results of two-way ANOVA with Tukey-Kramer multiple comparison tests; bars with the different letter represent means that are significantly different ($p < 0.05$)

7B). Interaction between growth stage and batch was not significantly different ($F_{1,260} = 0.10$, $p = 0.75$).

Although there was no significant difference in number of rows between batches (two-way ANOVA, $F_{1,65} = 0.07$, $p = 0.79$), significant difference was observed among growth stages (veliger larvae, post-larvae without peristomal shell, and post-larvae with peristomal shell) in 5-day-old individuals (two-way ANOVA, $F_{2,65} = 22.22$, $p < 0.0001$, Fig. 8). There was no significant interaction between batch and stage (two-way ANOVA, $F_{2,65} = 1.24$, $p = 0.30$). The number of rows were not significantly different between veliger and post-larvae without peristomal shell, but were significantly different between veliger and post-larvae with peristomal shell (Tukey-Kramer multiple comparison test, $p < 0.05$, Fig. 8).

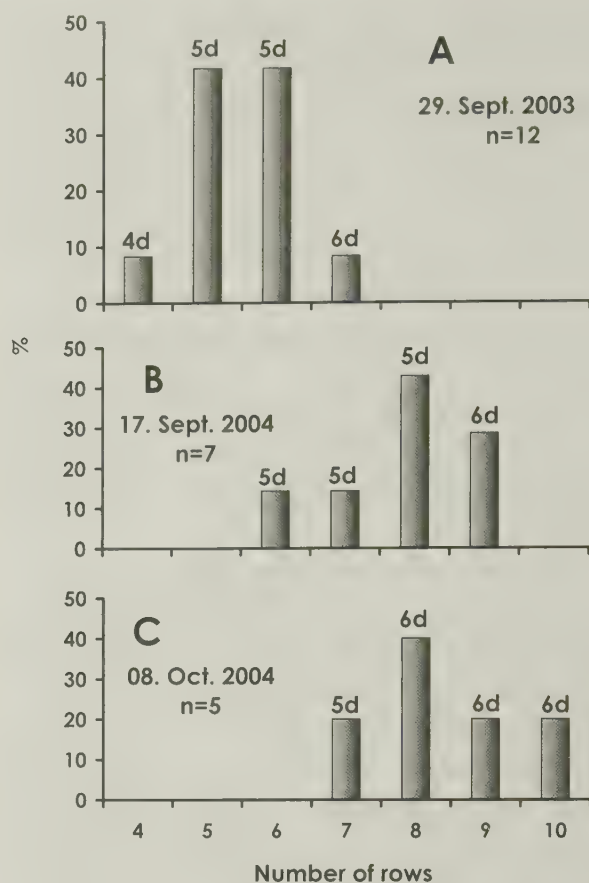


Fig. 9. Compositions of the number of rows of radular teeth on newly metamorphosed *Haliotis discus hannai* sampled in the field on 29 September 2003 (A, the mean temperature: 18.8 °C), 17 September 2004 (B, 20.1 °C), and 08 October (C, 19.1 °C). Determined ages (days) using the equation given in Table 6 are given above each bar.

3. Exp. III: Age determination of field caught larvae and post-larvae

3.1 Age determination of field caught larvae

H. discus hannai is the only abalone species found in the study area, and its veliger larva is distinguishable from other larval gastropods, though its egg and trochophore larva are unidentifiable based on their morphologies. Eighty eight veliger larvae with complete larval shell were identified in the field samplings conducted during September and October in 2003 and 2004. Veliger larvae showed discrete peaks of occurrence (on 8, 16, and 25 September in 2003, and 1 September and 5 October in 2004)

Table 5. Age determination by developmental stages and number of rows of radular teeth of the field caught larval abalone *Haliotis discus hannai*

Ssmpling date	Field temp. ^a	<i>n</i> of larvae m ⁻³	Developmental stage: <i>n</i> of larvae	<i>n</i> of rows	Estimated larval age (d)
		(°C)			
2003 20.Aug.	18.0±0.3	0.63	ES ^c : 1		2-3
01.Sept.	19.0±0.2	0.64	LS ^b : 5		1
08.Sept.	19.3±0.3	4.06	LS: 4		1
			ES: 7		2-3
			FR ^d : 2	3, 4	4, 4
09.Sept.	19.3±0.2	2.22	LS: 2		1
			ES: 11		2-3
			FR: 3	4, 4, 6	4, 4, 5
16.Sept.	18.9±0.6	3.96	LS: 18		1
			ES: 1		2-3
17.Sept.	19.1±0.3	0.42	ES: 1		2-3
25.Sept.	18.5±0.1	4.64	LS: 12		1
			ES: 1		2-3
2004 01.Sept.	20.6±0.4	3.13	LS: 2		1
			FR: 3	5, 7, 10	4, 5, 6
06.Sept.	20.1±0.3	0.63	LS: 1		1
09.Sept.	20.1±0.5	0.63	ES: 1		2-3
01.Oct.	20.1±0.1	0.63	LS: 1		1
05.Oct.	19.3±0.2	5.0	ES: 10		2-3
14.Oct.	18.6±0.1	1.25	LS: 1		2-3

^aThe mean±SD temperature for 2-5 days (depending on the developmental stage of captive larvae) before sampling date.
^bLS: Larvae with complete larval shell, but without the eye spot and radula.
^cES: Larvae with complete larval shell and eye spot, but without the radula.
^dFR: Larvae that had formed the radula in addition to complete larval shell and eye spot.
No larva was captured on 22, 25 August, 03, 12 September, 01 October in 2003, and 23, 27, 30 August, 13, 17, 21, 24, 27 September, 08, 12, 25 October in 2004.

but few larvae were collected even a couple of days after these peaks (Table 5). Forty three out of the 88 veligers did not have the eye spot, and only 8 larvae had formed a radula (Table 5). Based on the seawater temperature range experienced by the sampled larvae (18-21°C), about 2 days from fertilization are needed for the appearance of the eye spot (Table 3, Seki and Kan-no, 1977) and 4 days for the formation of the radula (Fig. 6). Thus at least 48% of the captured larvae were considered to be younger than 2 days old as they did not have the eye spot, and 90% of larvae were considered to be younger than 4 days old as they had not formed a radula.

The number of rows of radular teeth of the 8

larvae that had formed a radula ranged from 3 to 10. The age of larvae with radula was determined to range from 4 to 6 days old (Table 5).

3.2 Age determination of newly metamorphosed post-larvae

In 2003, 12 newly metamorphosed post-larvae, which had not acquired a peristomal shell, were collected on the collectors during 26-29 September. They were thought to be within a day of metamorphosis and thus the majority of radula formation would have occurred during the larval period (Fig. 8). The number of rows of the radular teeth of the post-larvae ranged from 4 to 7 (Fig. 9A). The mean field temperature during 25-29 September was 18.8

C. Consequently their ages were determined to be 4-6 days old. These post-larvae were probably from the same cohort of the larvae which was sampled in high numbers on 25 September 2003 (Table 5). On 2 October 2003 (3 days after the recovery of the collectors), 11 post-larvae were sampled by the boulder sampling, all of which had acquired a peristomal shell. No newly metamorphosed post-larvae without the peristomal shell were sampled at this time. The mean shell length of the post-larvae was $351.3 \pm 42.8 \mu\text{m}$ ($n=11$), which was considered to be at a few days after the metamorphosis.

In 2004, a total of 12 newly metamorphosed post-larvae were collected by the boulder sampling conducted on 17 September ($n=7$, the mean field temperature was 20.1°C) and 8 October ($n=5$, the mean field temperature was 19.1°C). The numbers of rows of these individuals ranged from 6 to 10 (Figs. 9B, C). Ages of newly metamorphosed post-larvae were determined as 5-6 days old.

Discussion

1. The effects of delayed metamorphosis on post-larval performance

Delaying the metamorphosis of marine invertebrates, which have lecithotrophic larval stage, has detrimental influence on post-metamorphic performance. The results of Exp. I show such negative effects in *H. discus hannai*. Longer larval period reduced post-larval survivorship and growth rate. Similarly, delaying metamorphosis altered post-larval survival and growth rates for *Haliotis iris* (Roberts and Lapworth, 2001), whereas *Haliotis rufescens* larvae were compromised by much shorter delays in metamorphosis (Searcy-Bernal, 1999).

Larval sensitivity to GABA as a cue for metamorphosis increased as larvae aged (Fig. 2). Such increased sensitivity with larval period to GABA has been demonstrated for larvae of *H. rufescens* (Barlow, 1990; Searcy-Bernal, 1999). GABA triggers larval attachment and metamorphosis by binding to molecular

receptors of veliger larvae (Morse *et al.*, 1979b). It is possible that increased sensitivity to GABA with larval period was caused by further development of receptors after the acquisition of metamorphic competence (Degnan and Morse, 1995).

Larvae that delay metamorphosis in the absence of metamorphosis cues, may experience nutritional stress during the delay period because of limited energy content of stored nutrients (Maldonado and Young, 1999). When metamorphosis of lecithotrophic larvae is delayed, individuals will either metamorphose spontaneously or die without metamorphosis (Woollacott *et al.*, 1989; Pechenik, 1990; Pechenik and Cerulli, 1991; Maldonado and Young, 1999; Roberts and Lapworth, 2001). In the present study, not one dead individual was observed as a larva, and most larvae metamorphosed into post-larvae without GABA (Fig. 3). Such spontaneous metamorphosis is possibly triggered when energy reserves of the lecithotrophic larva drop below some threshold level (Maldonado and Young, 1999). Interestingly, larvae began to metamorphose spontaneously after Day 17 (Fig. 3), which is close to the critical larval period (>15 days) affecting post-larval survival and growth (Figs. 4, 5). Duration of larval period without metamorphosis cues could be partly controlled by the amount of nutritional reserves.

It is also possible that spontaneous metamorphosis reflects greatly increased sensitivity to ambient stimuli present at an extremely low level (Coon *et al.*, 1990). Bacterial films, changes in water quality, and/or presence of individuals that had already metamorphosed into post-larvae could induce attachment and metamorphosis of aged swimming larvae (e.g. Pechenik, 1990). In this study, although we used FSW containing penicillin and streptomycin for rearing of larvae, it is possible that bacteria resistant to these antibiotics could have induced 'spontaneous' metamorphosis. It may be also consider that the antibiotics used probably do not remain active for weeks, so bacteria could enter assay chambers during

removal of metamorphosed animals after Day 15, and grow once antibiotic activity was sufficiently reduced. The ability of abalone larvae to delay metamorphosis could be enhanced if effective antibiotics and extremely clean rearing conditions are used. Roberts and Lapworth (2001) reported that most larval *H. iris* died by 38 days after fertilization without metamorphosis (at 17°C) when denied of a metamorphosis cue. The culturing methods of swimming larvae that Roberts and Lapworth used were very close to those of our study except for rearing temperature (present study: 20°C). This implies that either: (1) both larval *H. discus hannai* and *H. iris* do not metamorphose spontaneously but the level of sensitivity to ambient stimuli differs between species or (2) *H. discus hannai* truly spontaneously metamorphose without ambient stimuli but *H. iris* generally do not.

Influences of delayed metamorphosis on juvenile performance were reported even for planktotrophic (feeding) larvae of polychaetes that were fed sufficiently throughout larval period (Qian *et al.*, 1990; Qian and Pechenik, 1998). This suggests that nutritional stress is an insufficient explanation for the influence of extended larval life on post-metamorphic performance (Pechenik *et al.*, 1993; Qian and Pechenik, 1998; Roberts and Lapworth, 2001). It has been hypothesized that extreme delays in metamorphosis may affect post-larval fitness by compromising the larva's preparations for post-larval feeding and growth (Roberts and Lapworth, 2001).

Larval *H. discus hannai* require about 4 days before becoming competent to metamorphose (Seki and Kan-no, 1977). Results of Exp. I showed that metamorphosis was successfully achieved up to 19 days after fertilization at 20°C and there was no significant effect of delayed metamorphosis of less than 15 day larval period on post-metamorphic survival and growth. These results suggest a relatively longer larval period for abalone than that previously suggested (e.g. Ino, 1952) and this implies a potentially wide larval dispersion in the natural

environment.

2. Validity of the aging method by the number of rows of radular teeth

Rows of radular teeth of larval *H. discus hannai* were added at a constant rate as larvae aged (Exp. II, Fig. 6), and based on this relationship, we developed a method to determine the age of field caught larvae and newly metamorphosed post-larvae. An assumption of this aging method was that larval quality such as the amount of energy reserves did not affect the development rate of radula. Fukazawa *et al.* (2005) reported that eggs from a female with higher maturity contain higher protein and lipid content, and larvae from such eggs show greater survivorship. We used five female broodstock in different conditions such as size and degree of maturity (Table 1), which have been considered to affect quality of eggs and larvae to obtain the experimental larvae, but there were no significant differences in radular development among larvae from these females (Fig. 6). Kawamura *et al.* (2001) observed that 6-7-day-old larval *H. discus hannai* reared at 20°C had radulae with 11-13 rows using a scanning electron microscope (SEM). Roberts *et al.* (1999) also used a SEM and reported that larval radulae from 8-day-old *H. iris* reared at 16°C contained 9-10 rows. These results were closely consistent to those of this study using the light microscope with a Nomarski interference contrast system, and this may support the assumption that the development rate of the larval radula was unlikely affected by the female characteristics. Further, development rate may not vary widely between abalone species.

Temperature had significant effects on the radular development, but under all temperature treatments, which cover the environmentally relevant range: 17-22°C, the larval radula developed at a constant rate, and thus we could compare the rates among the different rearing temperatures. In addition, although number of females used were limited, response to the temperature changes in the development rate of

radula was not significantly different between two (17 and 22°C) or five batches (20°C). If the thermal history of field caught larvae is known, we can estimate the larval age using the rate at the mean field temperature, based on the Q_{10} values, and interpolated intercepts.

The sensitivity of the development rates was different between lower (17–20°C) and higher (20–22°C) temperatures. The Q_{10} value was larger at lower temperatures but smaller at higher temperatures (Table 4). In general, an unstressed animal in its normal temperature range should have a Q_{10} of around 2 (Cossins and Bowler, 1987), as it is observed across a wide range of organisms that metabolic reactions are slowed by approximately half when ambient temperature falls by 10°C. A Q_{10} of less than 2 indicates insensitivity of acclimation to temperature change. The maximum temperature in the habitat of *H. discus hannai* was usually around 22–23°C. Thus, a decline in the Q_{10} value for temperatures more than 20°C may be interpreted as a stress response.

Metamorphosed post-larvae had larger number of rows than the same age of veliger larvae (Fig. 7B) as demonstrated by Barlow and Truman (1992) for *H. rufescens*. It was previously reported that the number of rows of radular teeth increased rapidly during the first several days after settlement ($\sim < 500 \mu\text{m}$ shell length) in post-larval *H. iris* (Roberts *et al.*, 1999) and *H. discus hannai* (Kawamura *et al.*, 2001). Kawamura *et al.* (2001) suggested that abalone may need to develop the radula immediately after settlement to establish an effective feeding organ, since post-larval abalone begin feeding within a day of metamorphosis. The rapid increase in the number of rows of teeth in early post-larvae probably indicates the active formation of new rows of teeth before they start shedding worn teeth at the anterior end during feeding (Kawamura *et al.*, 2001). Thus, after the post-larvae start grazing, the increase in the number of rows of radular teeth may depend on the degree of hardness of the surface on which post-larvae graze using their radula. The growth of post-larvae influenced by

variable environment conditions may also affect the development rate of the radula (Roberts *et al.*, 1999; Kawamura *et al.*, 2001). Thus one might expect the reliability of the aging method using the number of rows of radular teeth would decrease when it is applied to older post-larvae. This method is only applicable to newly metamorphosed post-larvae, which had not acquired a peristomal shell (Fig. 8).

This study support previous research that the larval shell length does not increase with age prior to metamorphosis (Sasaki, 1985; Sasaki and Shepherd, 1995, Fig. 7A) and therefore larval shell length is not a useful character for aging larvae. Other characters used to age larvae are based on presence or absence and are only useful in the very early stages of development. Consequently, the aging method developed in this study could fill in a capability gap of aging larvae from three days onwards.

3. Possibility of the delayed metamorphosis in the field

All of the captured veliger larvae were determined to be younger than 7 days old and 90% of them were determined to be younger than 4–5 days old (Exp. III, Table 5). The larvae were sampled by vertical tows of a plankton net. Larval abalone show a clear positive phototaxis during the trochophore stage, but are negatively phototactic in the veliger stage (Yano and Ogawa, 1977). Therefore, there is a possibility that our larval samplings do not capture a considerable number of older larvae that occur near the bottom. The age of the newly metamorphosed post-larvae, however, which had not acquired the peristomal shell indicating that they are within a day of metamorphosis, were determined to be 4–6 days old (Fig. 9). Furthermore, the same cohort of larvae that were sampled on a large scale on 25 September 2003 (Table 5) was sampled as newly metamorphosed post-larvae on 29 September by the collectors, but no newly metamorphosed individuals were sampled on 2 October (3 days

after the recovery of collectors) on the boulders.

Since *H. discus hannai* become competent within 4 days after fertilization (Seki and Kanno, 1977), all the post-larvae sampled in this study were thought to have metamorphosed within a few days after the acquisition of competence. The results of Exp. I showed that larvae could delay metamorphosis until 15 days after fertilization with normal post-metamorphic fitness if sufficient food was available for post-larvae (Figs. 4, 5). This extended larval period implies that *H. discus hannai* larvae can potentially disperse for up to two weeks before successful metamorphosis. The larvae and post-larvae that were sampled, were in the area where they could successfully settle shortly after becoming competent. When larvae are carried offshore, it can be assumed that they would need to delay metamorphosis, and that if they are subsequently returned to settlement areas, they would be close to the bottom as larvae and few in number. This may explain why such abalone were not detected in this study.

Two different models on the larval transport are hypothesized for the abalone. The first assumes that larvae that enter the water column will be transported passively by water currents and disperse widely or be concentrated in eddies (Foster *et al.*, 1982; Tegner and Butler, 1985; Tanaka *et al.*, 1986; Shepherd *et al.*, 1992; Sasaki and Shepherd, 1995). The second postulates that larval dispersion is very limited and larvae are retained on the natal reef (Prince *et al.*, 1987, 1988; McShane *et al.*, 1988; Guzman del Prío *et al.*, 2000). If the dispersal depends on the duration of the larval period, shorter larval duration suggested in this study implies the later hypothesis, larval dispersion is localized. A study of population genetics on *H. discus hannai* also suggests that all natural populations collected from sampling sites, 2 to 10 km apart from each other, was experience extensive inbreeding and this imply limited dispersion of larvae (Hara and Kikuchi, 1992). The localized recruitment of larvae allows the

descendants of released hatchery-reared abalone to inhabit within or around the released areas.

Initial survival and growth of young post-larvae can be supported by the residual yolk reserves in addition to particulate feeding. During this period, the primary nutrition source for post-larvae is gradually transferred from the yolk supply to particulate food (Takami *et al.*, 2000; Roberts *et al.*, 2001). Post larval *H. discus discus* show massive mortality at a size of ~ 0.5 mm shell length under a lack of adequate food source in hatcheries (Ohashi, 1993). In the natural habitat, a number of dead or dying *H. discus hannai* with a shell length of 0.4–0.5 mm have often been observed, probably due to starvation (Sasaki and Shepherd, 2001). The food availability and residual yolk reserves at abalone metamorphosis are thought to be critical factors for survival and growth of newly metamorphosed post-larvae. The amount of yolk reserves available for post-larvae declines as their larval period becomes longer, and residual yolk has an important effect on the survival and growth of post-larvae as initial energy source (Roberts and Lapworth, 2001; Exp. I). Therefore, a short larval period in the field infers that larvae which settle on substrata with larger amounts of residual yolk have a greater potential to adapt to variable food availability.

At the sampling site of the present study, adult and juvenile abalone are constantly observed at relatively high densities every year compared with other sites in Miyagi Prefecture (A. Oshino, unpublished data). The sampling site could be suitable habitat for recruitment of post-larval abalone because of the high grazing pressure on CCA by adult and juvenile abalone which has been shown to play important roles in preventing CCA surface from being covered with competitively superior algae, in keeping the surface adequate for larval metamorphosis, and in providing suitable food sources for post-larvae (e.g. Kawamura, 1996; Kawamura *et al.*, 2002). The incidence of delayed metamorphosis is probably closely related to the availability of

suitable habitat for post-metamorphic individuals (reviewed by Pechenik, 1990). Therefore, delayed metamorphosis may be common only when larvae recruit into relatively unsuitable habitats for settlement and post-larval survival. The fact that the results of our study indicate that larval abalone did not delay metamorphosis may be because the study site is a suitable habitat for larval recruitment. Further study is needed on a wide spatially scale to better understand the larval ecology and recruitment process of *H. discus hannai*.

Acknowledgements

We wish to thank Hiroyuki Kawakami of Yamagata Sea Farming Association for providing the larval abalone used in Exp. I. We would like to also thank Ryo Sasaki, Akio Oshino, Teruo Tsukada, Keisaku Kusaka, and Hiroshi Ito of Kesennuma Miyagi Prefectural Fisheries Experimental Station for assistance in the field.

References

- Barlow L., 1990: Electrophysiological and behavioral responses of larvae of the red abalone (*Haliotis rufescens*) to settlement-inducing substances. *Bull. Mar. Sci.*, **46**, 537-554.
- Barlow L.A. and Truman J.W., 1992: Patterns of serotonin and SCP immunoreactivity during metamorphosis of the nervous system of the red abalone, *Haliotis rufescens*. *J. Neurobiol.*, **23**, 829-844.
- Bayne B.L., 1965: Growth and the delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L.). *Ophelia*, **2**, 1-47.
- Coon S.L., Fitt, W.K., and Bonar, D.B., 1990: Competence and delay of metamorphosis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.*, **106**, 379-387.
- Cossins A.R. and Bowler K., 1987: Temperature Biology of Animals, Chapman and Hall, London.
- Degnan D.M. and Morse D.E., 1995: Developmental and morphogenetic gene regulation in *Haliotis rufescens* larvae at metamorphosis. *Am. Zool.*, **35**, 391-398.
- Emlet R.B., 1986: Larval production, dispersal, and growth in a fjord: a case study on larvae of the sand dollar *Dendraster excentricus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **31**, 245-254.
- Forster G.R., Potts, G.W., and Swinfen, R., 1982: Changes in the ormer populations of Guernsey and Jersey. *J. Mar. Biol. Assoc. UK*, **62**, 717-727.
- Fukazawa H., Takami H., Kawamura T., and Watanabe Y., 2005: The effect of egg quality on larval period and post-larval survival of an abalone *Haliotis discus hannai*. *J. Shellfish Res.*, **24**, 1141-1147.
- Guzmán-del Prío S.A., Salinas F., Zaytsev O., Belmar-Pérez J., and Carrilo-Laguna, J., 2000: Potential dispersion of reproductive products and larval stages of abalone (*Haliotis* spp.) as a function of the hydrodynamics of Bahia Tortugas, Mexico. *J. Shellfish Res.*, **19**, 869-881.
- Hara M. and Kikuchi S., 1992: Genetic variability and population structure in the abalone, *Haliotis discus hannai*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **54**, 107-114 (in Japanese, with English abstract).
- Highsmith R.C., and Emlet R.B., 1986: Delayed metamorphosis: effects on growth and survival of juvenile sand dollars (Echinoidea: Clypeasteroidea). *Bull. Mar. Sci.*, **39**, 347-361.
- Ino T., 1952: Biological studies on the propagation of the Japanese abalone (genus *Haliotis*). *Bull. Tokai Reg. Fish. Res. Lab.*, **5**, 29-102 (in Japanese, with English abstract).
- Kawamura T., 1996: The role of benthic diatoms in the early life stages of the Japanese abalone (*Haliotis discus hannai*). In: Y. Watanabe, Y. Yamashita & Y. Oozeki (eds.). *Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources*. A. A. Balkema, Rotterdam, pp. 355-367.
- Kawamura T. and Takami, H., 1995: Analysis of

- feeding and growth rate of newly metamorphosed abalone *Haliotis discus hannai* fed on four species of benthic diatom. *Fisheries Sci.*, **61**, 357-358.
- Kawamura T., Takami H., Roberts R.D., and Yamashita Y., 2001: Radula development in abalone *Haliotis discus hannai* from larva to adult in relation to feeding transitions. *Fisheries Sci.*, **67**, 596-605.
- Kawamura T., Takami H., and Saido T., 2002: Early life ecology of abalone *Haliotis discus hannai* in relation to their recruitment fluctuations. *Fisheries Sci.*, **68**, *supp. 1*, 230-234.
- Kikuchi S. and Uki N., 1974: Technical study on artificial spawning of abalone, genus *Haliotis* I. Relation between water temperature and advancing sexual maturity of *Haliotis discus hannai*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **33**, 69-78 (in Japanese, with English abstract).
- Lucas M.I., Walker G., Holland D.L., and Crisp D.J., 1979: An energy budget for the free-swimming and metamorphosing larvae of *Balanus balanoides* (Crustacea: Cirripedia). *Mar. Biol.*, **55**, 221-229.
- Maldonado M. and Young C.M., 1999: Effects of the duration of larval life on postlarval stages of the demosponge *Sigmadocia caerulea*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **232**, 9-21.
- McEdward L.R., Carson S.F., and Chia F.S., 1988: Energetic content of eggs, larvae, and juveniles of *Florometra serratissima* and the implications for the evolution of crinoid life histories. *Int. J. Inv. Reprod. Dev.*, **13**, 9-22.
- McShane P.E., Black K.P., and Smith M.G., 1988: Recruitment processes in *Haliotis rubra* (Mollusca: Gastropoda) and regional hydrodynamics in southeastern Australia imply localized dispersal of larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **124**, 175-203.
- Miller B.A. and Emlet R.B., 1999: Development of newly metamorphosed juvenile sea urchins (*Strongylocentrotus franciscanus* and *S. purpuratus*): morphology, the effects of temperature and larval food ration, and a method for determining age. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **235**, 67-90.
- Morse D.E., Hooker N., Duncan H., and Jensen, L., 1979b: Gamma-aminobutyric acid, a neurotransmitter, induces planktonic abalone larvae to settle and begin metamorphosis. *Science*, **204**, 407-410.
- Moss G.E., 1999: Factors affecting settlement and early post-settlement survival of the New Zealand abalone *Haliotis australis*. *N. Z. J. Mar. Freshwater Res.*, **33**, 271-278.
- Nielsen C., 1981: On morphology and reproduction of *Hippodiplosia insculpta* and *Fenestrulina malusii* (Bryozoa, Cheilostomata). *Ophelia*, **20**, 91-125.
- Ohashi S., 1993: Yolk absorption of plantigrade juvenile abalone *Nordotis discus discus*. *Bull. Nagasaki Pref. Inst. Fish.*, **19**, 23-25 (in Japanese, with English abstract).
- Pechenik J.A., 1986: Field evidence for delayed metamorphosis of larval gastropods: *Crepidula plana* Say, *C. fornicata* (L.), and *Bittium alternatum* (Say). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **97**, 313-319.
- Pechenik J.A., 1990: Delayed metamorphosis by larvae of benthic marine invertebrates: Does it occur? Is there a price to pay? *Ophelia*, **32**, 63-94.
- Pechenik J.A. and Cerulli T.R., 1991: Influence of delayed metamorphosis on survival, growth, and reproduction of the marine polychaete *Capitella* sp. I. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **151**, 17-27.
- Pechenik J.A., Rittschof D., and Schmidt A.R., 1993: Influence of delayed metamorphosis on survival and growth of juvenile barnacles *Balanus amphitrite*. *Mar. Biol.*, **115**, 287-294.
- Prince J.D., Sellers T.L., Ford W.B., and Talbot S.R., 1987: Experimental evidence for limited dispersal of haliotid larvae (genus *Haliotis*; Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **106**, 243-263.
- Prince J.D., Sellers T.L., Ford W.B., and Talbot S.R., 1988: Confirmation of a relationship between the localized abundance of breeding stock and recruitment for *Haliotis*

- rubra* Leach (Mollusca: Gastropoda). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **122**, 91-104.
- Qian P.-Y., McEdward L.R., and Chia F.-S., 1990: Effects of delayed settlement on survival, growth, and reproduction in the spionid polychaete, *Polydora ligni*. *Invert. Reprod. Dev.*, **18**, 147-152.
- Qian P.-Y. and Pechenik J.A., 1998: Effects of larval starvation and delayed metamorphosis on juvenile survival and growth of the tube-dwelling polychaete *Hydroides elegans* (Haswell). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **227**, 169-185.
- Roberts R.D. and Lapworth C., 2001: Effect of delayed metamorphosis on larval competence, and post-larval survival and growth, in the abalone *Haliotis iris* Gmelin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **258**, 1-13.
- Roberts R.D., Kawamura T., and Takami H., 1999: Morphological changes in the radula of abalone (*Haliotis iris*) during postlarval development. *J. Shellfish Res.*, **18**, 637-644.
- Roberts R.D., Lapworth C., and Barker R., 2001: Effect of starvation on the growth and survival of post-larval abalone (*Haliotis iris*). *Aquaculture*, **200**, 323-338.
- Sasaki R., 1985: Larval identification and occurrence of ezo abalone, *Haliotis discus hannai*, in the adjacent waters of Kesennuma Bay, Miyagi Prefecture, Japan. *Suisan Zoshoku*, **32**, 214-219 (in Japanese).
- Sasaki R. and Shepherd S.A., 1995: Larval dispersal and recruitment of *Haliotis discus hannai* and *Tegula* spp. on Miyagi coasts, Japan. *Mar. Freshwater Res.*, **46**, 519-529.
- Sasaki R. and Shepherd S.A., 2001: Ecology and post-settlement survival of the ezo abalone *Haliotis discus hannai*, on Miyagi coasts, Japan. *J. Shellfish Res.*, **20**, 619-626.
- Schmidt-Nielsen K., 1990: Animal Physiology: Adaptation and Environment, 4th ed. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Searcy-Bernal R., 1999: Settlement and post-larval ecology of the red abalone *Haliotis rufescens* in culture systems. PhD Thesis. University of California, Davis and San Diego State University.
- Seki T. and Kan-no H., 1977: Synchronized control of early life in the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, Haliotidae, Gastropoda. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **38**, 143-153 (in Japanese, with English abstract).
- Shepherd S.A., Lowe D., and Partington, D., 1992: Studies on southern Australian abalone (genus *Haliotis*) XIII. Larval dispersal and recruitment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **164**, 247-260.
- Takami H., Kawamura T., and Yamashita Y., 1997: Contribution of diatoms as food sources for post-larval abalone *Haliotis discus hannai* on a crustose coralline alga. *Moll. Res.*, **18**, 143-151.
- Takami H., Kawamura T., and Yamashita Y., 2000: Starvation tolerance of newly metamorphosed abalone *Haliotis discus hannai*. *Fisheries Sci.*, **66**, 1180-1182.
- Takami H., Kawamura T., and Yamashita Y., 2002: Effects of delayed metamorphosis on larval competence, and post-larval survival and growth of abalone *Haliotis discus hannai*. *Aquaculture*, **213**, 311-322.
- Takami H., Oshino A., Sasaki R., Fukazawa H., and Kawamura T., 2006: Age determination and estimation of larval period in field caught abalone (*Haliotis discus hannai* Ino 1953) larvae and newly metamorphosed post-larvae by counts of radular teeth rows. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **328**, 289-301.
- Tanaka K., Tanaka T., Ishida O., and Ohba T., 1986: On the distribution of swimming and deposited larvae of nursery ground of abalone at the southern coast of Chiba Prefecture. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **52**, 1525-1532 (in Japanese, with English abstract).
- Tegner M.J. and Butler R.A., 1985: Drift-tube study of the dispersal potential of green abalone (*Haliotis fulgens*) larvae in the southern California Bight: implications for recovery of depleted populations. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **26**, 73-84.
- Thorson G., 1950: Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol. Rev.*, **25**, 1-45.
- Tong L.J. and Moss G.A., 1992: The New

- Zealand culture system for abalone, in "Abalone of the World: Biology, Fisheries and Culture" (ed. by Shepherd S.A., Tegner M.J., and Guzmán-del Prío S.A.), Fishing News Books, Oxford, Blackwell, pp. 583-591.
- Uki N. and Kikuchi S., 1984: Regulation of maturation and spawning of an abalone *Haliotis* (Gastropoda), by external environmental factors. *Aquaculture*, **39**, 247-261.
- Woollacott R.M., Pechenik J.A., and Imbalzano K.M., 1989: Effects of duration of larval swimming period on early colony development in *Bugula stolonifera* (Bryozoa: Cheilostomata). *Mar. Biol.*, **102**, 57-63.
- Yano I. and Ogawa Y., 1977: Effects of light, temperature and hydrostatic pressure on vertical distribution of abalone larvae, *Haliotis gigantea*. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, **91**, 19-27 (in Japanese, with English abstract).

エゾアワビ当歳稚貝量に及ぼす親貝密度の影響

干川 裕^{*1}・高橋和寛^{*1}・津田藤典^{*1}・町口裕二^{*2}

Effect of adult density on 0⁺ juvenile density of the abalone *Haliotis discus hannai*.

Hiroshi HOSHIKAWA^{*1}, Kazuhiro TAKAHASHI^{*1}, Fujinori TSUDA^{*1}
and Yuji MACHIGUCHI^{*2}

Abstract The density of adult abalone, *Haliotis discus hannai*, was enhanced by releasing artificially reared juveniles (ca. shell length 50mm) to clarify the effect of adult density on the amount of recruitment near the study area. Though the density of abalone in 2001 before the release of artificial juveniles was 0.09 individuals/m², the density increased significantly to 1.18 individuals/m² after releasing reared juveniles in 2002 and in 2003. The released abalone matured and spawned normally in each year. The density of 0⁺-juveniles (SL 4.6-11.6mm) sampled in winter increased significantly from 0.8 individuals/m² in 2002 to 3.5 individuals/m² in 2004.

Key words: Abalone, *Haliotis discus hannai*, adult density, 0⁺ juvenile density

北海道におけるエゾアワビ漁獲量は1970年代以降急速に減少して1984年には100 t 以下になり、近年若干増加傾向にあるものの低水準で推移している（干川，2002）。親貝が少なくなると産卵量が減るだけでなく、体外受精を行うアワビ類では個体間距離が増すと受精率も低下してしまうため（Babcock and Keesing, 1999），稚貝発生量の低下を招いている可能性が考えられる（河村ら，2002）。エゾアワビを含むアワビ類では産卵から幼生の着底までの期間が約1週間と短いため、ホタテガイやウニ類に比べると親貝の近くに幼生が着底する可能性が高いと思われる。

一旦減少したエゾアワビの資源を回復するためには、再生産に有効な水準まで、人為的に親貝密度を高める必要がある。具体的には、禁漁に加えて成貝の移殖や大型人工種苗の放流により短期間に親貝集団を形成することが有効な施策と思われる。しかし、その前提となる親貝密度と加入量との関係は明らかにされていない。

本研究では人工種苗を中間育成した殻長50mmのエゾアワビを用いて親貝の生息密度を人為的に高めることで、周囲に加入する稚貝数が増加するかどうかを野外で定量的に把握することを目的とした。

調査方法

試験場所

試験区は小樽市の西15kmに位置する忍路湾の湾奥部で、海岸線に沿って約150m、沖方向は潮間帯から水深2～4mの転石・玉石帯が砂泥に変わるまでの範囲とした（Fig. 1）。また、地元の漁業者の協力を得て、試験区内でのエゾアワビ漁業は2001年以降禁漁とした。試験区及びその周辺に6本の調査線（L0～5）を配し、下記に述べる親貝及び当歳貝の密度調査を行った。

2005年11月30日受理 (Received: November 30, 2005)

^{*1} 北海道立中央水産試験場〒046-8555 北海道余市郡余市町浜中町238 (Hokkaido Central Fisheries Experimental Station, 238 Hamanaka, Yoichi, Hokkaido 046-8555, Japan)

^{*2} 水産庁増殖推進部〒100-8907 東京都千代田区霞が関 (Resources Enhancement Promotion Department, Fisheries Agency of Japan, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8907, Japan)

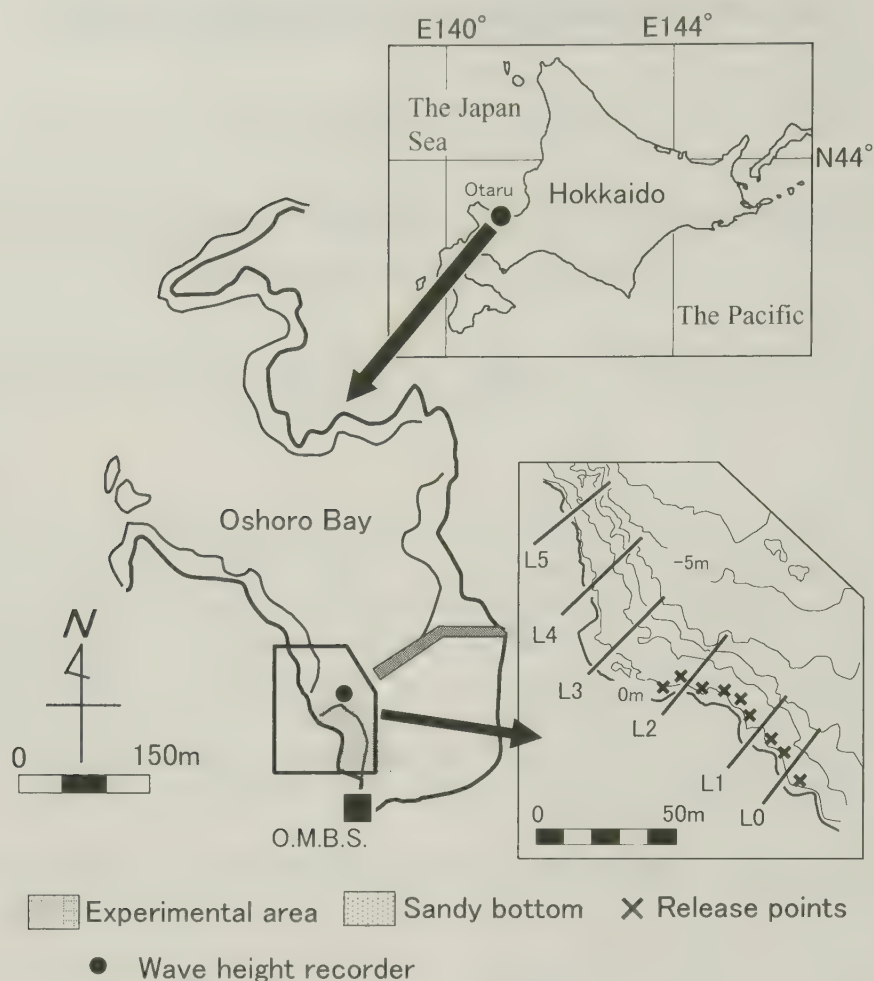


Fig. 1. Map of the field experimental area. O.M.B.S.:Oshoro Marine Biological Station of Hokkaido University.

人工種苗放流及び親貝密度調査

2001年9月14日にはL1, 3, 5に沿って5m毎に1m²内のエゾアワビを採集し、人工種苗放流前のエゾアワビ生息密度を求めた。2002年5月14日に平均殻長51.6mmのエゾアワビ人工種苗5,000個体を、2003年5月19日に平均殻長49.6mmのエゾアワビ人工種苗6,000個体をL0～2の平磯縁辺部（水深1.2～1.5m）およびL3（2002年のみ水深2m）の海底にSCUBA潜水で放流した。これらの人工種苗は(社)北海道栽培漁業振興公社熊石事業所で生産され、中間育成を経た2歳貝であった。

2002年5月から2004年3月まで、毎月1回、試験区内の調査線L0～3に沿って、両側に1m²枠を連続して置き、中のエゾアワビを放流年別放流貝と天然貝に分けて計数した。この調査では殻長約40mm以上を計数対象とした。

枠取り調査とベルトトランセクト調査の結果を用い

て、人工種苗放流前の2001年と放流後の2002年及び2003年の親貝密度をKruskal Wallis検定とBonferroniの不等式により有意水準を修正したMann-Whitney検定により比較した。

放流貝の成長と成熟

2002年5月15日、6月18日、7月15日、8月19日、9月17日、11月11日、2003年7月8日、8月22日、10月1日、11月20日に試験区内からエゾアワビを各回任意に25～123個体採集し、年別放流貝と天然貝に分けて、殻長をノギス、重量を電子天秤で測定後、菊池・浮(1974)に従って目視による生殖巣指数を観察し再び放流した。また、2003年10月1日には試験区外側のL5付近からも53個体のエゾアワビを採集し同様の測定を行った。

浮遊幼生調査

2002年6月27日から10月3日までと2003年6月2日

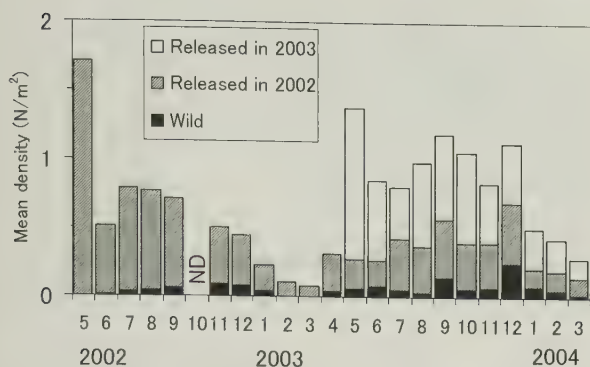


Fig. 2. Mean density of abalone in the experimental area. ND: No Data.

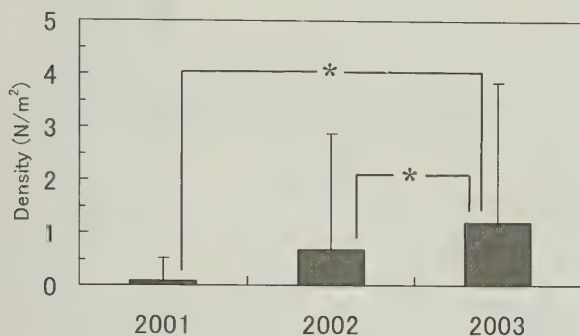


Fig. 3. Adult density of abalone on September. Vertical bars show standard deviation. *: Significant difference ($p < 0.05$).

から10月7日の間、毎週2回の頻度で、プランクトンネット（口径30cm、奥行き120cm、目合い100 μ m）を使って、水深1m以浅の表層を曳網距離150mで水平曳きし、浮遊幼生の採集を行った。採集した標本は10%ホルマリンで固定し、双眼実体顕微鏡下でエゾアワビのベリジャー幼生を計数した。

当歳貝密度調査

2001年10月15日、2002年10月21日、及び2003年11月11日に試験区内及び周辺に配したL1～5の5本の調査線に沿って、起点から5m毎に1 m^2 枠内のエゾアワビ当歳貝をSCUBA潜水により目視で採集した。また、2002年2月4日、2003年1月16日、及び2004年1月26日には試験区内の定点（調査線L0からL1にかけての水深1.5～3mの地点）でSCUBA潜水により任意に海底に1 m^2 枠を置いて、枠内の当歳貝を採集した。採集枠数は2002年と2003年が10枠、2004年が16枠であった。これらの調査で採集した稚貝はノギスで殻長を測定後、70%エチルアルコールで固定した。当歳貝密度の年比較は親貝密度と同じ検定方法を用いた。

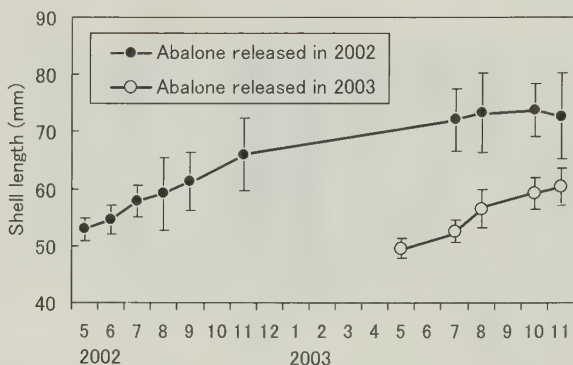


Fig. 4. Growth of released abalone. Vertical bars show standard deviation.

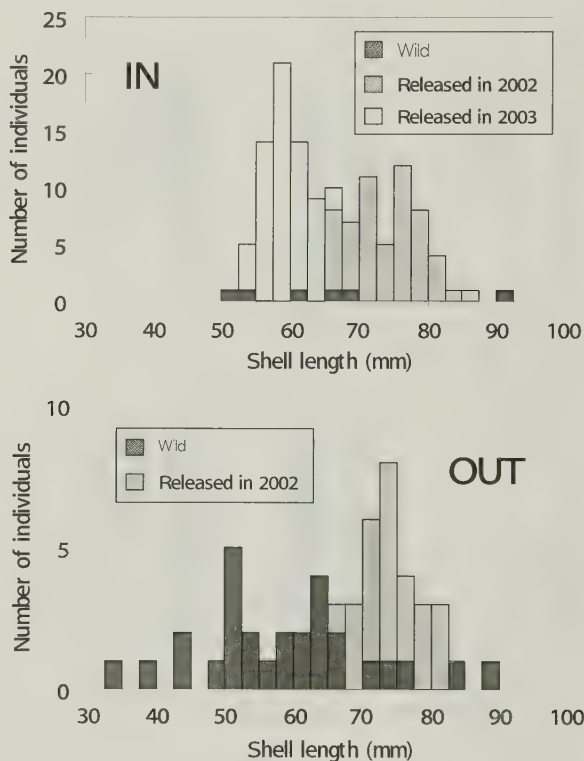


Fig. 5. Shell length distribution of abalone in and out of the experimental area

産卵時期における波高観測

2001年7月8日から10月22日までと、2002年6月27日から10月21日までの間、Fig. 1に示した忍路湾内の水深3mの地点で波高と水温の観測を行った。観測には水圧感知型波高計（(株)IOテクニック社製WH102）を用いた。また、この期間以外の試験区周辺の水温を記憶式水温計（Onset社製Optic StowAway Temp Logger）により観測した。

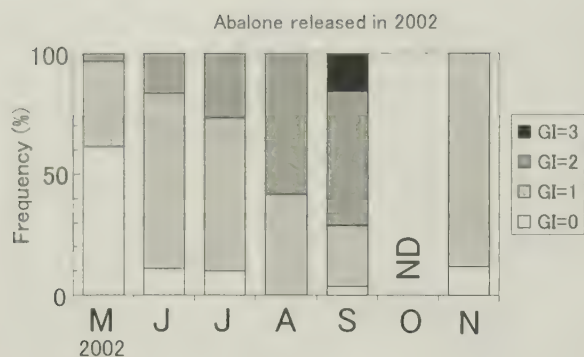


Fig. 6. Gonadal index of abalone released in 2002

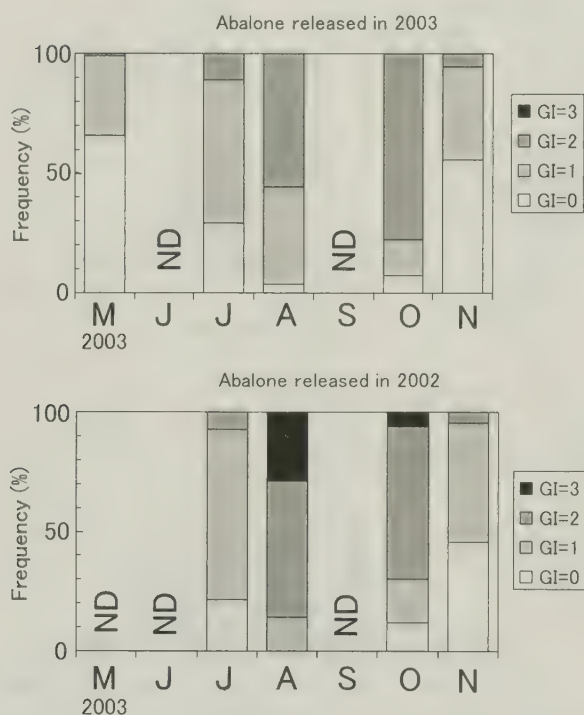


Fig. 7. Gonadal index of abalone released in 2002 and 2003

結 果

親貝密度の推移

2002年5月14日にエゾアワビ人工種苗を放流した結果、親貝密度は1.71個体/m²になったが、6月以降12月までは0.79~0.45個体/m²で推移し、その後1月~3月にかけて減少した(Fig.2)。2003年5月19日に再びエゾアワビ人工種苗を放流したことで、密度は1.38個体/m²に増加したが、6月以降12月までは1.13~0.81個体/m²であり、その後再び減少した。2002年放流貝の密

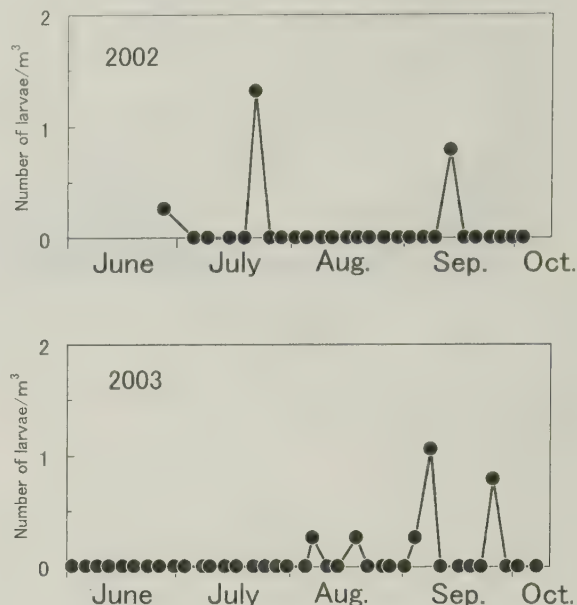


Fig. 8. Appearance of the veliger larvae of abalone

度は冬期間に減少するが、4月以降増加することから、冬期間の減少は発見率の低下によると思われる。2002年放流貝では放流直後の密度(1.71個体/m²)に対して1年6ヵ月後の密度(0.33個体/m²)は19.3%であった。

産卵盛期にあたる9月の親貝密度は、2001年が0.09個体/m²で、全て天然貝であった。天然貝の密度は2002年が0.06個体/m²、2003年が0.14個体/m²とほとんど変わらなかったが、放流された人工種苗の密度は2002年が0.65個体/m²、2003年が1.04個体/m²と高くなった。このため、2003年の親貝密度は1.18個体/m²となり、2001年の13倍に増加した(Fig. 3)。親貝密度に年間で差があることが確認されたので(Kruskal Wallis検定, $p=0.001$), Mann-Whitney検定を行ったところ2001年と2003年、2002年と2003年の親貝密度に有意差($p=0.005$, $p=0.002$)が認められた。

放流貝の成長、成熟と産卵状況

2002年に放流された種苗は、放流時には平均殻長52.9mmであったが、半年後の11月には66.0mmまで成長し、翌年の7月には72.1mmに達した(Fig. 4)。しかし、この時期から成長の鈍化が観察された。2003年放流群は、放流時の平均殻長が49.6mmであったが、半年後の11月には60.3mmになった。

2003年10月1日に試験区周辺で採集したエゾアワビの殻長組成をFig. 5に示した。試験区内では放流貝が全体の94.8%と多かった。試験区外でも47.1%が2002

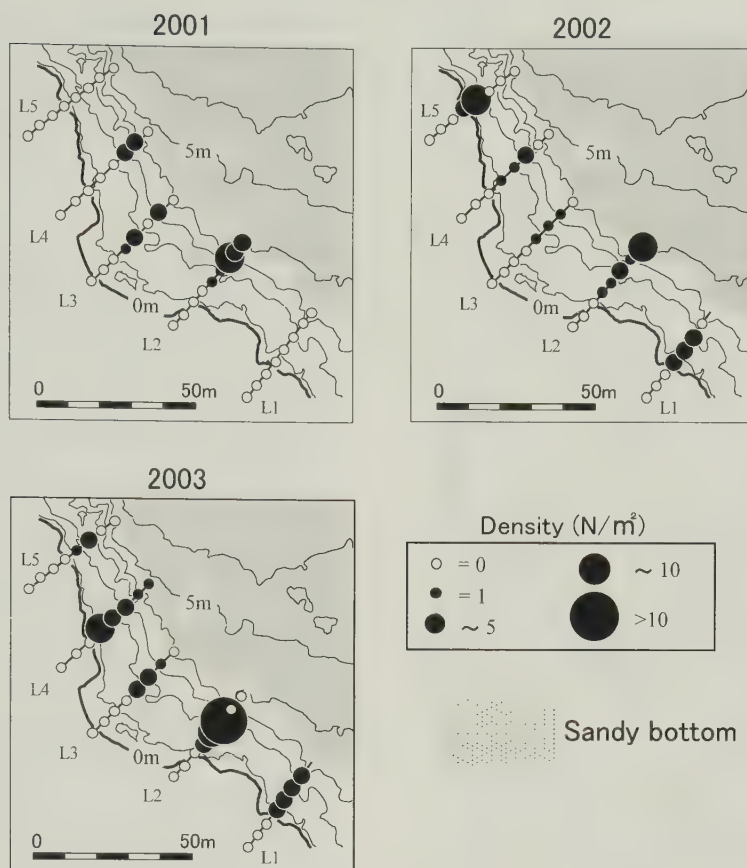


Fig. 9. Distribution of 0+ juveniles of abalone

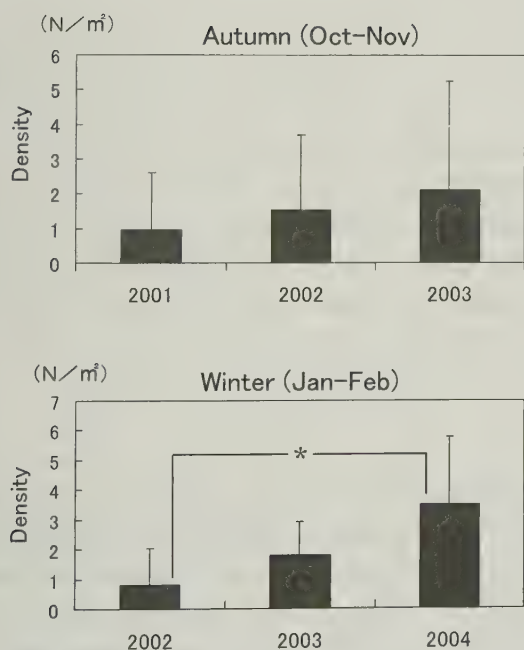


Fig. 10. Density of 0+ juveniles in autumn and winter. Vertical bars show standard deviation. *: Significant difference ($p < 0.05$).

年放流貝であり、成長に伴い広い範囲に移動している可能性が示唆された。また、殻長65mm以上の大型個体に占める放流貝の割合は78.1%であった。

2002年と2003年の放流貝の時期別生殖巣指数 (GI) をFig. 6 と 7 に示した。2002年では、5月にはGI 0 の個体が61.7%を占め最も多かったが、6月にはGI 1 の個体が72.2%になり、GI 2 の個体も出現した。8月にはGI 2 の個体が58.1%になり、9月にはGI 3 の個体も観察された。しかし、10月には大部分がGI 1 であった。このため、放流貝の産卵時期は8月から9月と思われた。

2003年では、2002年放流貝と2003年放流貝を分けて成熟状況を調べた (Fig. 7)。2003年放流貝は5月にはGI 0 の割合が65.6%と高かったが、その後GI 1 及びGI 2 の割合が増加し、GI 2 は8月で55.6%、10月で77.8%になった。GI 3 の個体は観察されなかったが、10月に熟度の進んだ個体の比率が高く、11月になると指数の低下が起こったことから、産卵時期は10月と思われた。

2002年放流貝は7月ではGI 1 が最も多く71.4%であったが、8月にはGI 2 が57.1%になりGI 3 も28.6%を占

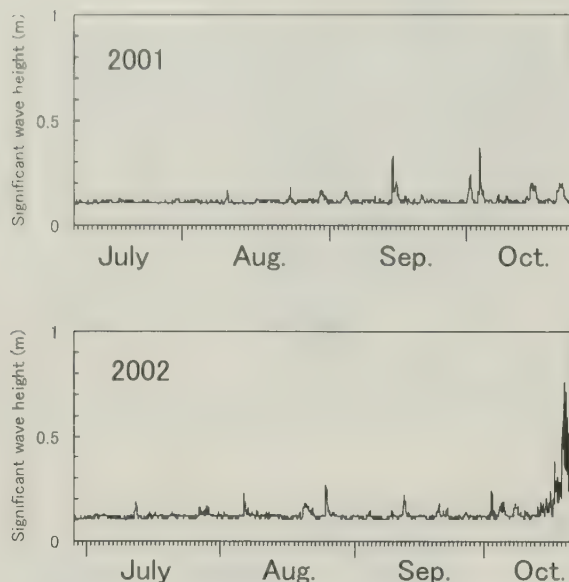


Fig. 11. The significant wave height in Oshoro Bay.

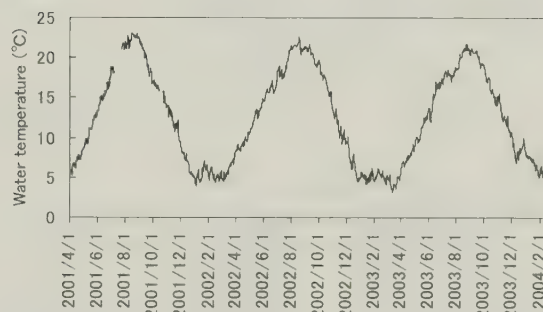


Fig. 12. Water temperature in Oshoro Bay during the experimental period.

めた。10月でもGI2の比率は64%と高く、GI3の個体も観察された。しかし、11月になるとGI0の割合が45.5%に増加した。2002年放流貝は2003年放流貝に比べ、時期的に早い8月から産卵を開始し、その状態が10月まで続いたと考えられた。

2002年の浮遊幼生調査では、試験開始時の6月27日と7月22日、および9月13日に0.2~1.3個体/m³のベリジャー幼生が採集された (Fig. 8)。2002年放流貝の産卵時期は8月から9月と推定されたことから、9月に観察されたベリジャー幼生は放流貝に起因している可能性があるが、6月と7月の浮遊幼生は天然貝に由来していると思われる。北海道日本海沿岸ではエゾアワビの産卵時期は8~10月であり、6月に浮遊幼生が出現したことは過去の事例に比べるとかなり早い。また、6月27日には、海底から取り上げた石から殻長

0.35mmの稚貝が採集された。2003年に実施した浮遊幼生調査では、8月7日、19日、9月4日、8日、および25日に0.2~1.0個体/m³のベリジャー幼生が採集された。これらの時期は、生殖巣指数に基づいて推定した産卵時期と一致していた。

当歳貝密度の推移

10月下旬から11月上旬に実施した秋季の当歳貝調査では、平均殻長6.95mm(2001年)、7.16mm(2003年)、7.05mm(2004年)の当歳稚貝が採集された。人工種苗を放流しなかった2001年でも試験区周辺で当歳貝の発生が確認されたが、親貝密度が増加した2003年の調査ではより広い範囲に多くの稚貝が分布していることが確認された (Fig. 9)。平均密度は、2001年は0.97個体/m²、2002年は1.52個体/m²、2003年は2.10個体/m²と増加する傾向が見られたが、Kruskal Wallis検定の結果有意差はなかった (Fig. 10, $p=0.14$)。

また、1月~2月上旬にかけて実施した冬季の稚貝調査では、稚貝の平均殻長は9.25mm(2002年)、8.81mm(2003年)、8.80mm(2004年)であった。平均密度は2002年の0.80個体/m²に対して、2003年は1.80個体/m²、2004年は3.50個体/m²となり、年間で稚貝密度に有意差が確認され (Kruskal Wallis検定, $p=0.006$)、2004年の稚貝密度は2002年のものに比べて有意に高かった (Fig. 10; Mann-Whitney検定, $p=0.006$)。

試験区周辺の波高と水温

2001年と2002年の7月~10月までの有義波高を Fig. 11に示した。2001年は観測期間中、0.5m以下の風ぎの状態が続いた。2002年には10月19日に有義波高が0.7mまで高くなったが、それ以外は0.5m以下であった。

忍路湾の2001年4月から2004年2月までの水温を Fig. 12に示した。水温は冬期には2002年1月に3.9℃まで、2003年3月に3.1℃まで下降し、夏期には8月の水温が最も高く、2001年は23.0℃、2002年8月は22.5℃、2003年8月は21.7℃まで上昇した。

考 察

北海道南西部の噴火湾では、天然のエゾアワビは分布していなかったが、主に奥尻島からの天然種苗の移植により漁業の対象となる資源が形成されたことが報告されている (Saito, 1979)。移植された種苗は正常に成熟し (八幡, 高野, 1970)、加入した稚貝も確認された (Saito, 1981)。噴火湾における稚貝加入量に影響を与える要因として、親貝量と冬期水温が挙げられ、親貝密度の増加に伴い加入量も増えることが報告され

ている（田嶋ら，1996）。また，道内をはじめ本州まで天然種苗を供給していた奥尻島では，道内の他の漁場に比べ親貝密度が4.3～13.3個体/㎡と高く，親貝密度の増加に伴い稚貝密度の最大値は増加することが報告されている（田嶋ら，1996）。

エゾアワビ浮遊幼生の発生速度は水温によって影響を受け，20℃では受精から74.6時間後には着底可能となり，85.5時間後から変態を開始することが知られている（関，菅野，1977；関，菅野，1981）。このように，幼生は産卵した親貝集団の周辺に着底する可能性が高く，親貝量が加入量に及ぼす影響が大きいことが考えられる。したがって，今回の試験では，殻長約50mmの大型人工種苗を放流することによって親貝密度を人為的に増加させた結果，周囲に加入した稚貝量が増加したものと考えられる。

2003年10月に試験区周辺で調べた殻長組成では，放流貝が大型個体の大部分を占めていた（Fig. 5）。エゾアワビでは殻長の増加に伴い生殖巣内の抱卵数も増加することが知られている（佐々木，2001）。放流サイズを殻長50mmと大型にした目的は，放流した年に成熟し再生産に参加するだけでなく，その後の成長に伴い産卵量を増加させることにあった。しかし，2002年放流貝では，放流から半年以降の成長は鈍化していた（Fig. 4）。Saito（1979）は，日本海の奥尻島と噴火湾内の豊浦でエゾアワビの成長を比較し，豊浦で成長が良い理由として海藻類の生育状況の差を挙げている。磯焼けが進行し，エゾアワビの餌料となるホソメコンブなどの海藻が少ない北海道南西部日本海沿岸では，親貝集団の形成において大型人工種苗放流の効果を有効に活かすために，桑原ら（2001）が提案しているような藻場造成により海藻群落を確保する必要がある。

また，放流貝の成長だけでなく生残も親貝集団の形成の重要な要因である。2002年放流貝では2003年の1月～3月までは発見数が減少したが，4月以降増加し，2004年の1月以降再び減少した（Fig. 2）。このような冬期間の発見率の低下は，水温の低下に伴いエゾアワビが深所に移動することや，摂餌など海底表面での活動が少なくなったためと思われる。放流から1年半後までの残留率は19.3%であり，減少した理由として試験区外への移動（Fig. 5）と死亡が考えられる。成熟状況の調査で採捕した放流貝の足部縁辺部に傷のある個体が多く観察されることから，試験区周辺の玉石帯に多く生息するイソガニやヒライソガニ，イシガニ等による捕食の可能性が考えられる。また，冬には試験区内でミスダコが観察され，捕食された貝も確認されている。

宮城県ではエゾアワビの大規模産卵は，有義波高が

4 m以上の日と一致し，小規模産卵は有義波高が2～4 mの時期と対応することが報告されている（佐々木，2001）。台風が接近するような海況では大規模産卵が起こり，ベリジャー幼生は離岸数kmまで広域に分散するが，小規模な産卵時には幼生の分散は地先に限られる。エゾアワビの産卵時期に当たる7月～10月にかけて忍路湾内で観測した有義波高は1 m以下であり，風が続くことから，試験期間中は浮遊幼生が広域に流出した可能性は低いと思われる。

佐々木（2001）は，エゾアワビは種の存続をはかるため浮遊幼生を広範囲に分散し新たな着底繁殖域へと拡散し遺伝子交流をはかるⅠ型（大量一回産卵・広域分散型）と従来の繁殖分布域を確保し再生産関係を維持するⅡ型（少量多回産卵・地先滞留型）の繁殖戦略を両立展開していると述べている。親貝密度を高め周囲への加入を期待する場合には，佐々木のⅡ型戦略に基づく再生産過程が重要になる。今回の調査では，親貝の実際の産卵回数は確かめられていないが，生殖巣指数が高い期間が長いことと，浮遊幼生の出現が散発的であったことから，集団として複数回の産卵があった可能性が考えられる。

富田ら（1980）は1977年と1978年の9月上旬に北海道日本海の礼文島西海岸でエゾアワビ浮遊幼生の分布を調べ，両年とも岸近くで幼生の密度が高かったことを報告している。北海道の日本海沿岸では，エゾアワビの産卵時期に当たる夏から秋にかけては比較的穏やかな波浪環境にあるため親貝集団の近隣に幼生が着底することが期待されるが，親貝集団を形成する場所と当歳貝の加入範囲の関係を検討する際には沿岸の潮流を調べる必要がある。また，周辺に加入した稚貝が人工種苗放流により形成された親貝集団に由来しているかどうかは，DNAマーカーにより直接親子関係を確認する方法があり，この課題については今後研究を進める必要がある。

謝 辞

本研究を実施するに当たり，漁場の提供や禁漁区の設定等でお世話になった小樽市漁業協同組合忍路地区の漁業者の方々に厚くお礼を申し上げる。また，現地調査において協力頂いた北海道立中央水産試験場の職員各位，（株）海洋探査職員一同並びに故工藤敬吾氏に感謝の意を表する。

文 献

- Babcock R. and Keesing J., 1999 : Fertilization biology of the abalone *Haliotis laevis*: laboratory and field studies. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **56**, 1668-1678.
- 干川 裕, 2002 : 北海道におけるエゾアワビの資源変動. 月刊海洋, **34**(7), 470-476.
- 河村知彦, 高見秀輝, 西洞孝広, 2002 : アワビ類の天然稚貝発生量を定める要因は何か?. 月刊海洋, **34**(7), 529-534.
- 菊池省吾, 浮 永久, 1974 : アワビ属の採卵技術に関する研究 第1報エゾアワビ *Haliotis discus hannai* INO の性成熟と温度との関係. 東北水研研報, **33**, 69-78.
- 桑原久実, 川井唯史, 金田友紀, 2001 : 北海道南西部磯焼け海域におけるホソメコンブ群落の形成機構. 水産工学, **38**(2), 159-165.
- Saito K., 1979 : Studies on propagation of ezo abalone, *Haliotis discus hannai* Ino-I Analysis of the relationship between transplantation and catch in Funka bay coast. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **45**(6), 695-704.
- Saito K., 1981 : The appearance and growth of 0-year-old ezo abalone. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **47**(11), 1393-1400.
- 佐々木 良, 2001 : エゾアワビの加入機構に関する生態学的研究. 宮城水産研報, **1**, 1-86.
- 関 哲夫, 菅野 尚, 1977 : エゾアワビの初期発生と水温による発生速度の制御. 東北水研研報, **38**, 143-153.
- 関 哲夫, 菅野 尚, 1981 : エゾアワビの被面子幼生の着底と変態について. 東北水研研報, **42**, 31-29.
- 田嶋健一郎, 高谷義幸, 大崎正二, 中多章文, 宮本建樹, 干川 裕, 川真田憲治, 1996 : 親貝資源状態の把握. 特定研究開発促進事業—アワビの再生産機構の解明に関する研究—総括報告書, 21-43.
- 富田恭司, 田嶋健一郎, 杉本 卓, 1980 : 北海道北部日本海沿岸におけるエゾアワビの浮遊幼生, 底生初期稚貝の出現. 北水試月報, **37**, 117-126.
- 八幡剛浩, 高野和則, 1970 : エゾアワビの生殖巣成熟について. 第1報 松前・礼文両地における生殖巣成熟の比較. 北大水産彙報, **21**(3), 193-199.

マイクロサテライト DNA マーカーからみたアワビ人工種苗の遺伝的変異性

原 素之^{*1}・関野正志^{*2}

Genetic variation in artificial seed of Japanese abalone, *Haliotis discus* based on microsatellite DNA

Motoyuki HARA^{*1}, and Masashi SEKINO^{*2}

Abstract For evaluating the efficacy of the developed microsatellite DNA markers to detect changes of genetic diversity in artificial seed populations and to estimate the impact into natural populations due to stocking practice, we analyzed genetic variations within and between four artificial seed populations and four natural populations of Japanese abalone *Haliotis discus* containing Ezo-awabi and Kuro-awabi. All of 9 microsatellite loci screened in this study showed polymorphisms with highly variations. Marked reductions of genetic variability in artificial seed populations compared with the natural populations were observed in terms of number of microsatellite alleles. Significant differentiation was between the Ezo-awabi and Kuro-awabi, between the artificial seed populations and natural populations, and between the artificial seed populations. We conclude that, based on the decreased genetic variability observed in all the artificial seed populations examined, bottlenecked effects occurred when each artificial seed population was founded.

Key words: artificial seed, bottlenecked effect, genetic diversity, *Haliotis discus*, microsatellite DNA

アワビ類は市場価値や漁獲量からみて最も重要な沿岸資源の一つであるが、近年の漁獲量の減少は著しく1970年頃の最盛期と比べ半分以上に低下している。アワビ類では1980年代の種々の種苗生産技術の開発によって、人工種苗を大量にかつ安定的に生産できるシステムが確立され、各地に人工種苗の生産施設が建設されるようになり、多くの人工種苗の生産が可能になった。これらの大部分は、天然アワビ漁場に放流されており、栽培漁業関係者の努力により、毎年2000万尾以上の人工種苗が全国数百ヶ所の漁場に放流されている（栽培漁業種苗生産統計2004）。その結果、地先市場での漁獲アワビに占める人工種苗の割合が、5割以上となって

いる地区も出現している。このことは、漁場での混合率に差はあるものの放流された人工種苗が数年間漁場に留まり漁獲サイズまで成長していることを意味している。アワビの漁獲サイズは9～12cm程であるが、4～7cmとされている生物学的最小形からみても（市来, 1980）、放流された人工種苗放流は、漁場において新しく添加された資源だけではなく、再生産を通しての定着資源になる可能性が十分に考えられる。

一方、人工種苗の生産では施設規模や生産コストの点から実際の種苗生産に使われる親貝数に限界があり、天然漁場で発生した集団と比較すると遺伝的変異性が低いことが報告されている（木島ら, 1992; Hara and

2005年11月30日受理 (Received: November 30, 2005)

^{*1} 養殖研究所 〒516-0193 三重県度会郡南伊勢町中津浜浦422-1(National Research institute of Aquaculture, 422-1 Minamiise, Mie, 516-0193, Japan)

^{*2} 東北区水産研究所 〒985-0000 宮城県塩竈市新浜町2-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute, 3-27-5, Shioyama, Miyagi, 980-0000, Japan)

Sekino, 2002)。遺伝的変異性の減少は環境の変化に対する適応力を低下させる可能性を高めることから (Allendorf, 1986), 人工種苗の継続的な放流による遺伝学的影響への関心が持たれている。しかし、アワビでは遺伝的分析法の変異性の問題などから、人工種苗の天然漁場への影響調査への試みは殆ど行われていない。そこで、本課題では高変異マーカーとして知られているマイクロサテライトDNAマーカーを開発し、それらを用いてアワビ天然発生集団と比較しながら人工種苗の遺伝的変異性および遺伝的特性を把握し、今後の人工種苗放流の天然漁場への影響を調査するために有効な遺伝マーカーの開発を行った。

材料と方法

アワビの試料

天然集団として、北海道奥尻と岩手県広田の地先から採集したエゾアワビ、三重県鳥羽および徳島県牟岐地先から採集したクロアワビを用いた。これらのアワビには、人工種苗と判断される貝殻にグリーンマークがないことを確かめた。人工種苗としては、岩手県内、三重県内および兵庫県内のアワビ種苗生産場で生産されたアワビ種苗を用いた。これらのサンプリング情報はTable 1に示した。DNAは各個体の足筋肉部からフェノール・クロロホルム法 (Sambrook *et al.*, 1989)により抽出した。

マイクロサテライトDNAマーカーの単離

マイクロサテライトDNAライブラリーは北海道奥尻産のエゾアワビから抽出したDNAを用い、Sekino and Hara (2001)の方法に従い調整した。このDNAライブラリーから白色コロニーを無作為に拾い出し、

GFX Micro Plasmid 抽出キット (Amerham Bioscience)を用いて、プラスミドDNAを抽出、精製した。(CA)*n*または(CT)*n*の陽性クローンについて、サイクルシーケンス法を用いて、塩基配列を決定した。シーケンス反応には、5' Cy 5 標識したKS primer およびReverse primerとシーケンスキット (Thermo Sequence fluorescent labeled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGPT,Amersham)を使用し、シーケンスには蛍光DNAシーケンサー (ALF express, Pharmacia)を使用した。得られた塩基配列のデータから、プライマー設計ソフト (Primer Premier, Premier Biosoft International)によって、CAリピートを挟む領域で、最適なプライマーを設計した。

設計プライマーは、北海道奥尻産の集団を用いて、PCR反応で増幅の可否を調べた。PCR反応は、20 pmolsのCy 5で蛍光標識した各プライマーセット、100 μMのdNTP、0.5ユニットのampliTaq Gold, Taqに添付された10倍希釈バッファーと50ngのDNAテンプレートを加え、10~15 μLの容量で行った。反応条件は、プレヒーティングが95℃で12分、合成反応が95℃で30秒、各プライマーのアニール温度で45秒、75℃で45秒を35-42サイクルし、最後に72℃で5-7分のDNA伸長反応を行った。

アリルは標準サイズマーカー (100~300bp, Pharmacia)との比較により、PCR産物のサイズを決めた。

統計的处理

各集団におけるアリル数、ヘテロ接合体率の観察値 (*H_o*)と期待値 (*H_e*)は遺伝解析ソフトCERVUS version 2.0を使って計算した。アリル数は分析個体数に依存するため、アリル数の比較には遺伝解析ソフトFSTATで求めたAllelic Richnessを用いた (Goudet,

Table 1. Sampling sites, date of sampling, and sample size of the 10 Japanese abalone populations

Sampling site (Prefecture)	Source of populations*1	Population abbreviation	Date sampled	Sample size
Okushiri (Hokkaido)	NE	KO	Jul.,1999	96
Taro (Iwate)	NE	KT	Nov.,2000	96
Ijika (Mie)	NK	KL	Aug.,1999	68
Mugi (Tokushima)	NK	KM	Aug.,2000	96
Iwate-1 (Iwate)	AE	T	Apr.,1999	48
Iwate-2 (Iwate)	AE	X	Apr.,2000	48
Mie-1 (Mie)	AK	H	Nov.,1999	48
Hyougo-1 (Hyogo)	AK	KH	Nov.,1999	48

For geographical positions of populations, see Fig.1

*1 E:Ezo-awabi distributed region; K:Kuro-awabi distributed region

2001)。それぞれの集団の各座における Hardy-Weinberg 平衡の適合は、Markov-chain法を用いた Fisher's exact テストで確率を求め、Bonferroni 補正 (Rice, 1989) し有意性の検討を行った。

集団間の異質性を調べるため F_{ST} とその確率を用いた (Weir and Cockerham, 1984)。これらの値は遺伝解析ソフト ARLEQUIN (Schenider and Kueffer, 1997) を用いて計算した。さらに、各集団の遺伝的類縁関係をみるため、Cavalli-Sforza (Nei *et. al.*, 1983) の遺伝的距離 (D_A) を求め、近隣結合法 (NJ法, Saito and Nei, 1987) によって TREEVIEW ソフト (Page, 1996) を用いて類縁図を作成した。

結果および考察

マイクロサテライトDNAマーカーの遺伝的変異性

エゾアワビDNAからマイクロサテライトDNA領域を単離し、それらの領域についてPCRプライマーを設計し、増幅性や変異性を検討した結果、集団の遺伝的変異性を安定的に分析できるマーカーとして、9つのマイクロサテライトマーカー座が開発された。Table 2 にマイクロサテライトDNA領域の反復の型、プライマーの配列、アニール温度およびGenBank登録番号を示した。

エゾアワビDNAから設計した9つのPCRプライマーはクロアワビにおいても問題なくPCR産物が増幅された。エゾアワビの天然2集団、人工種苗2集団、クロアワビの天然集団2集団および人工種苗2集団のアリル頻度をAppendix A に、そして、Table 3 にそれらの遺伝的変異性を示した。全ての集団の全ての座においてアリル数が2以上あり多型を示し、各座の変異の程度は大きく異なっていた。遺伝マーカーの性能を表す指標の一つとなる変異性では、天然集団の平均アリル数 (A) で9.0~9.7、平均ヘテロ接合体率 (H_e) で0.556~0.633と、藤尾ら(1989)が報告しているアロザイムマーカーの変異性 (A : 2.9, H_e : 0.21) と比較して明らかに高かった。

集団間の遺伝的違い

エゾアワビとクロアワビ、および人工種苗と天然集団間における遺伝的違いについて調べた。エゾアワビとクロアワビの集団間では、アリル頻度に特徴ある頻度組成が示された。また、各集団の座当りの Allelic Richness は5.7から8.3、ヘテロ接合体率の観察値 (H_o) と期待値 (H_e) の平均はそれぞれ0.495~0.649と0.525~0.649であった。これらの遺伝的変異性を表す指標においては違いが認められなかった。人工種苗と天然集

Table 2. Microsatellite primer sequences developed from Ezo-awabi *Haliotis discus Hannai**1

Locus	Repeat motif(5'-3')	Primer sequence (5'-3')	Anneal (°C)	Gen Bank accession
<i>Hd527</i>	(CTCA) ₉	F-tgt aaa gac cct cgt cat ttg ga R-agc agc tga cac gcc gtg ata t	55	AB178064
<i>Hd535</i>	(CTCA) ₁₄	F-ttt aac tct aca tgc cga ag R-tac tgt cag tcc aca tag gat	58	AB178065
<i>Hd553</i>	(CTCA) ₆	F-ttg cta aaa gcg gcg taa aac a R-tgc cac cac tac gac ata caa aga	58	AB178066
<i>Hd601</i>	(CGCA) ₅ (CA) ₉	F-ttg ctc cca aag gaa aga ac R-atg ttt aca att ctg tat gtt cag ct	58	AB178069
<i>Hd604</i>	(AAT) ₁₉	F-gtg tca gtt ctc caa aca ctt R-gaa aag gac tca aca agc ag	55	AB178070
<i>Hd680</i>	(CTCA) ₅	F-cac tta ggg ctt tcc tcc cac att R-tga gtg gct atg caa aca acc atg	55	AB178073
<i>Hd715</i>	(CTCA) ₅	F-gaa gcc cat ttc tgg tgt cc R-cgt tct gtt cat acg cat agt g	55	AB178074
<i>Hd731</i>	(ATG) ₁₄	F-gtt tat tgt tgt gcc aaa ccg a R-ggt tta att caa agt gac gga	58	AB178077
<i>Hd1147</i>	(AGGCG) ₅	F-tat ttc agc ctg att aac cct gtg R-acg ctt act caa ctt ggc act tac	58	AB178083

*1 A total of 25 microsatellite markers were developed, of which 9 markers were used (see text)

Table 3. Basic statistics of within-population genetic variability estimated for the 4 wild and the 4 artificial populations

Locus	Wild population				Artificial pseed Opulation			
	Ezo-awabi		Kuro-awabi		Ezo-awabi		Kuro-awabi	
	KO (n=96)	KT (n=96)	L (n=96)	KM (n=96)	T (n=48)	X (n=48)	H (n=48)	KH (n=48)
<i>Hd527</i> A/ <i>Arich</i>	4/3.8	4/3.2	3/2.7	3/2.5	2/2.0	3/2.9	3/3.0	3/3.0
<i>Ho/H_E</i>	0.135/0.139	0.083/0.081	0.147/0.163	0.167/0.172	0.083/0.118	0.208/0.191	0.021/0.063	0.104/0.101
<i>P</i>	0.386	1.000	0.417	0.580	0.151	1.000	0.013*	1.000
<i>Hd535</i> A/ <i>Arich</i>	15/13.1	20/16.2	20/18	18/15.4	12/11.9	10/9.9	14/13.9	13/13.0
<i>Ho/H_E</i>	0.882/0.894	0.896/0.913	0.868/0.922	0.802/0.911	0.854/0.868	0.917/0.842	0.872/0.892	0.936/0.892
<i>P</i>	0.695	0.784	0.727	0.031*	0.415	0.126	0.250	0.112
<i>Hd553</i> A/ <i>Arich</i>	7/5.6	6/5.4	5/5	5/4.5	4/4.0	3/3.0	6/6.0	6/6.0
<i>Ho/H_E</i>	0.245/0.278	0.458/0.499	0.632/0.673	0.708/0.634	0.479/0.412	0.688/0.470	0.583/0.620	0.625/0.741
<i>P</i>	0.137	0.596	0.404	0.549	0.828	0.0003*	0.037*	0.0023**
<i>Hd601</i> A/ <i>Arich</i>	16/12.7	14/11.9	16/13.8	19/14.9	10/9.9	7/7.0	10/8.9	14/13.7
<i>Ho/H_E</i>	0.583/0.582	0.677/0.706	0.638/0.795	0.781/0.793	0.667/0.763	0.638/0.666	0.604/0.639	0.833/0.826
<i>P</i>	0.070	0.054	0.159	0.956	0.0049**	0.044*	0.980	0.464
<i>Hd604</i> A/ <i>Arich</i>	16/14.2	14/13	13/12.7	14/12.5	10/10.0	9/7.0	13/12.9	12/11.9
<i>Ho/H_E</i>	0.823/0.854	0.833/0.895	0.868/0.896	0.842/0.906	0.771/0.832	0.717/0.782	0.854/0.899	0.854/0.864
<i>P</i>	0.421	0.100	0.903	0.564	0.518	0.321	0.489	0.178
<i>Hd680</i> A/ <i>Arich</i>	6/4.7	6/5.4	7/6	7/5.9	5/5.0	4/4.0	5/4.9	6/5.9
<i>Ho/H_E</i>	0.632/0.62	0.552/0.627	0.485/0.525	0.51/0.553	0.625/0.692	0.500/0.641	0.250/0.282	0.500/0.509
<i>P</i>	0.949	0.584	0.440	0.677	0.436	0.068	0.020*	0.776
<i>Hd715</i> A/ <i>Arich</i>	9/8.2	9/7.3	9/8.6	8/7.3	7/6.9	8/7.8	6/6.0	5/5.0
<i>Ho/H_E</i>	0.490/0.52	0.458/0.456	0.544/0.547	0.448/0.514	0.563/0.661	0.833/0.737	0.458/0.478	0.479/0.406
<i>P</i>	0.328	0.979	0.202	0.027*	0.123	0.613	0.470	0.962
<i>Hd731</i> A/ <i>Arich</i>	9/7.7	8/7.7	5/5	7/5.9	6/6.0	6/6.0	3/3.0	5/5.0
<i>Ho/H_E</i>	0.798/0.758	0.719/0.786	0.559/0.665	0.596/0.617	0.681/0.790	0.652/0.697	0.625/0.608	0.609/0.651
<i>P</i>	0.849	0.200	0.244	0.992	0.014*	0.212	0.022*	0.027*
<i>Hd1147</i> A/ <i>Arich</i>	5/4.5	5/4.7	3/3	4/3.4	4/4.0	4/4.0	3/3.0	3/3.0
<i>Ho/H_E</i>	0.688/0.723	0.75/0.733	0.294/0.338	0.292/0.33	0.708/0.708	0.689/0.728	0.188/0.241	0.542/0.645
<i>P</i>	0.726	0.713	0.302	0.317	0.247	0.490	0.011*	0.411
Mean A/ <i>Arich</i>	9.7/8.3	9.6/8.3	9.0/8.3	9.4/8.0	6.7/6.6	6.0/5.7	7.0/6.8	7.4/7.4
<i>Ho/H_E</i>	0.586/0.596	0.603/0.633	0.559/0.614	0.572/0.603	0.603/0.649	0.649/0.639	0.495/0.525	0.609/0.626

1) Probanility value of Hardy-Weinberg equilibrium testing obtained by a test analogous to Fisher's exact test with the Markov-chain method (Markov-chain, 100000; dememorization, 100000) is shown. Significance is determined by adding * (uncorrected significance level, $P < 0.05$) and ** (corrected significance level for eight simultaneous test, $P < 0.006$). A, number of alleles; Arich, allelic richness; He, unbiased expected heterozygosity.

団の比較では、前者でロットによる大きな振れや低頻度のアリの喪失傾向がみられた。そして、Allelic Richnessでは、人工種苗が5.7~7.4と天然集団の8.0~8.3と比較して有意に低かった ($P<0.05$)。平均ヘテロ接合体率では、 H_o と H_e ではともに違いが認められなかったが、クロアワビ人工種苗Hの H_e では明らかに低い値を示し、ロットによる違いが検出された。これらの結果は、エゾアワビについてアロザイムを用いて解析した結果と矛盾しなかった (木島ら, 1992; 古殿ら, 1995)。人工種苗における遺伝的変異性の減少は、限られた親によって生産させることによるビン首効果が大きな原因になると推察されている (Allendorf and Phelps, 1980)。さらに、変異性の減少はヘテロ接合体率よりもアレル数に大きな影響を与えるとされており (Allendorf, 1986)、今回分析した人工種苗のアレル数の減少もビン首効果が大きな要因と思われる。ビン首効果による集団の有効な大きさの縮小は、まずアレル数の減少に表れ、さらに集団が縮小するとヘテロ接合体の減少に繋がると予測されることから、これらの2つの指標が集団を管理する上で重要と思われる。

殆どの座においてホモ接合体過剰傾向がみられたが、天然集団では各座において H_o と H_e での大きな差はなく、ヌルアレルの存在の可能性は低いと考えられた。さらに、Hardy-Weinberg平衡から有意にずれたと推定された座は、人工種苗において36のうち11で、天然集団ではKMに2つ存在した ($P<0.05$)。しかし、Bonferroni補正を行うと人工種苗において3座のみが有意と認められた ($K=9$, $P<0.006$)。これらのことは、今回分析に用いた9つの遺伝マーカーは集団を遺伝的観点から管理する解析ツールとして有効であることを示唆している。

集団間の遺伝的関係

集団間の遺伝的違いを調べるために F_{ST} 値を求め Table 4 に示した。クロアワビ天然集団間 (LとKM) を除く全ての組合せ集団間で遺伝的に有意な違いが認められた ($P<0.001$)。人工集団間の F_{ST} 値は天然集団間の値に比べて高く、さらにエゾアワビとクロアワビの間で人工種苗および天然集団において高かった。エゾアワビとクロアワビ、および人工種苗と天然集団の遺伝的関係をみるためにCavalli-Sforzaの遺伝的距離 (D_A) を用いて近隣結合法により類縁図を描き、Fig. 1 に示した。この遺伝的類縁関係図からエゾアワビとクロアワビが大きく分かれることがわかる。近年、エゾアワビの種苗生産は順調なものクロアワビでは病気が原因とされる大量斃死が頻発しており (Momoyama 1999)、一部のクロアワビ生息域ではエゾアワビ人工種

苗の放流が続けられていることから、これらのマーカーはクロアワビ生息域でのエゾアワビの影響を調べるために有効と思われる。さらに、集団間の類縁関係では近接した天然集団と人工種苗が他の集団と比べて近い関係であることがわかる。すなわち、分析に使用した人工種苗では集団間での明らかな遺伝的違いがあるものの、種苗生産には地域の天然親貝を使用していることから地域の遺伝的組成を反映してと考えられる。

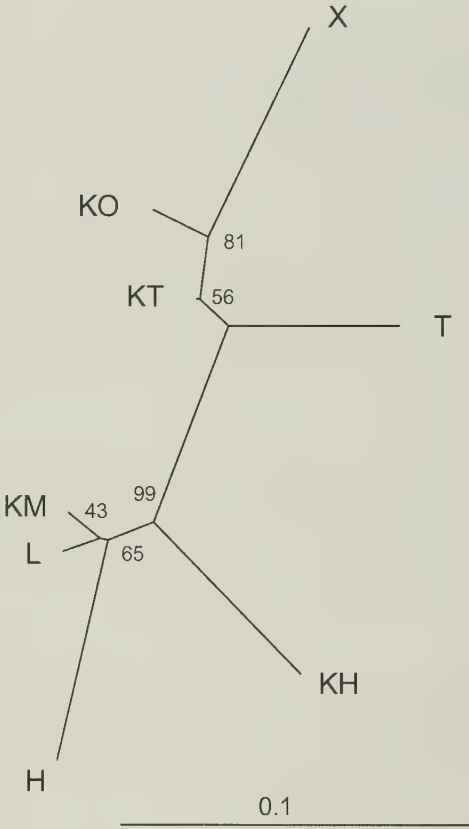


Fig. 1. Unrooted neighbor-joining tree based on modified Cavalli-Sforza chord distance (D_A). The numbers refer to percentage bootstrap values generated from 1000 replications of resampled loci.

Table 4. Pairwise multilocus F_{ST} (θ) calculated for the 4 artificial and the 4 natural abalone populations based on 9 microsatellites¹⁾ (above diagonal), and genetic distances modified Cavalli-Sforza chord (D_A) between the 8 abalone populations (below diagonal).

Population	Ezo-awabi habitat population				Kuro-awabi habitat population			
	KO	KT	L	KM	T	X	H	KH
KO	-	0.008(0.000)**	0.108(0.000)**	0.111(0.000)**	0.028(0.000)**	0.032(0.000)**	0.167(0.000)**	0.096(0.000)**
KT	0.030	-	0.064(0.000)**	0.069(0.000)**	0.020(0.000)**	0.025(0.000)**	0.111(0.000)**	0.055(0.000)**
L	0.140	0.098	-	-0.002(0.878)	0.062(0.000)**	0.094(0.000)**	0.026(0.000)**	0.038(0.000)**
KM	0.133	0.096	0.023	-	0.064(0.000)**	0.099(0.000)**	0.026(0.000)**	0.039(0.000)**
T	0.078	0.076	0.141	0.127	-	0.047(0.000)**	0.120(0.000)**	0.067(0.000)**
X	0.084	0.092	0.191	0.180	0.133	-	0.143(0.000)**	0.083(0.000)**
H	0.208	0.148	0.078	0.080	0.192	0.235	-	0.069(0.000)**
KH	0.166	0.127	0.087	0.094	0.173	0.218	0.136	-

¹⁾ Probability value associated with the θ is given in parenthesis. Significant departure of the θ value from zero is determined by adding ** (significance level for 45 simultaneous tests: $P < 0.001$).

ま と め

開発されたアワビの9つのマイクロサテライトDNAマーカーは、既存のアロザイムマーカーと比較して遺伝的変異性が高いことから、人工種苗間および人工種苗と天然集団間の遺伝的変異性を高感度に調べることが可能になった。これらの遺伝マーカーを用いて、人工種苗と天然集団の遺伝的組成が大きく異なること、低頻度のアレルの多くが消失すること、エゾアワビとクロアワビで異なることが示された。10%の遺伝的変異性の減少は適応に関連する形質に影響を与えるという報告がある (Allendorf and Ryman, 1987)。今後、放流種苗の天然漁場への遺伝的影響をできるだけ少なくするためには、放流漁場に近接した水域から採集した親を使い、集団の有効な大きさが適切に維持されるよう放流種苗の遺伝的組成や変異性を監視しながらの種苗生産体制が必要と考えられる。

謝 辞

本研究は、水産総合研究センター交付金プロ研「生態系保全型増殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発 (平成13~15年度) によって行ったもので、本研究の推進のためご指導およびご助言をいただいた評価委員、プロジェクトリーダーおよびチームリーダーの皆様に感謝します。特に、アワビサブチームリーダーの堀井豊充博士にはいろいろな面でのご支援を頂き厚くお礼申し上げます。

文 献

Allendorf F.W., 1986: Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biol.*, **5**, 181-190.

Allendorf F.W. and Stevan R.P., 1980: Loss of genetic variation in hatchery stock of cutthroat trout. *Trans. Am. Fish. Soc.*, **109**, 537-543.

Goudet J., 2001: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

Fujio Y., Oniwa K., Yuzawa A., and Takahashi K., 1989: Genetic variability and population structure in abalone. In: *Genetic Assessment Project Report in 1985-1988*, Japan Fisheries Resource Conversation Association, 459-476.

Hara M. and Sekino M., 2002: Development of

- techniques for genetic monitoring in released populations of Pacific abalone, *Haliotis discus* using microsatellite markers. *Second international symposium on stock enhancement and sea ranching*, Book of abstract, **74**.
- 市来忠彦, 1980: 長崎県宇久島沿岸におけるクロアワビの成長. 長崎水試研報, **6**, 11-21.
- Kijima A., Ikeda M., and Fujio Y., 1992: Genetic characteristic of the artificial seed populations of abalone. *FISH Fish Genetics and Breeding Sciences*, **18**, 53-63.
- Momoyama K., Nakatsugawa T., and Yurano N., 1999: Mass mortalities of juvenile abalone, *Haliotis* spp., caused by amyotrophia. *Pathology*, **34**, 7-14.
- Nei M., Tajima F., and Tatenno Y., 1983: Accuracy of estimated phylogenetic tree from molecular data, II: gene frequency data. *J. Mol. Evol.*, **19**, 153-170.
- Page R.D.M., 1996: Treeview: an application to display phylogenetic tree on personal computers. *Comp. Appl. Bio. Sci.*, **12**, 357-358.
- Saito N. and Nei M., 1987: The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic tree. *Mol. Biol. Evol.*, **4**, 406-425.
- Schneider S., Kueffer J.M., Roessli D., and Excoffier L., 1997: ARLEQUIN Version 1.1: a software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Univ. of Geneva, Switzerland.
- Sekino M. and Hara M., 2001: Microsatellites DNA loci in Japanese abalone *Haliotis discus discus* (Mollusca, Gastropoda, Haliotidae). *Mol. Ecol. Note*, **1**, 8-10.
- Rice W. R., 1989: Analyzing table of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Weir B. S. and Cockerham C. C., 1984: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.

Appendix A
Allele frequency distributions of 9 microsatellite loci for eight Japanese abalone samples

Locus	Allele	Natural population				Artificial population				Locus				Natural population				Artificial population			
		KO	KT	L	KM	T	X	H	KH	KO	KT	L	KM	T	X	H	KH				
L527	109	0.036	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	L535	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000				
	111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.021	0.846	0.677	0.441	0.453	0.750	0.656	0.240	0.333				
	115	0.927	0.958	0.912	0.906	0.938	0.896	0.968	0.948	0.027	0.057	0.110	0.083	0.156	0.000	0.063	0.073				
	119	0.016	0.016	0.000	0.005	0.063	0.094	0.000	0.031	0.085	0.198	0.346	0.391	0.073	0.323	0.563	0.354				
	123	0.021	0.021	0.081	0.089	0.000	0.010	0.011	0.000	0.005	0.047	0.059	0.068	0.000	0.021	0.083	0.135				
	127	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.010	0.044	0.005	0.021	0.000	0.031	0.031				
L535	152	0.011	0.031	0.007	0.000	0.000	0.010	0.043	0.011	L601	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.073				
	164	0.005	0.005	0.015	0.052	0.010	0.000	0.000	0.000		0.021	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
	168	0.032	0.021	0.044	0.052	0.000	0.000	0.011	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
	172	0.000	0.031	0.022	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000		0.042	0.068	0.022	0.010	0.052	0.053	0.032	0.010			
	174	0.000	0.000	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000		0.005	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.021	0.000			
	176	0.194	0.094	0.125	0.172	0.250	0.021	0.160	0.170		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000			
	180	0.059	0.078	0.051	0.099	0.073	0.188	0.053	0.096		0.000	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021			
	184	0.075	0.120	0.125	0.115	0.135	0.000	0.085	0.043		0.000	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021			
	186	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000		0.016	0.036	0.015	0.016	0.104	0.021	0.000	0.000			
	188	0.140	0.120	0.103	0.099	0.125	0.250	0.074	0.096		0.635	0.505	0.294	0.323	0.437	0.532	0.436	0.365			
	192	0.102	0.125	0.088	0.068	0.104	0.219	0.064	0.202		0.089	0.172	0.316	0.302	0.188	0.191	0.436	0.073			
	196	0.091	0.130	0.074	0.083	0.042	0.063	0.223	0.000		0.021	0.052	0.110	0.068	0.000	0.000	0.021	0.094			
	200	0.124	0.083	0.088	0.073	0.021	0.063	0.085	0.106		0.063	0.042	0.074	0.052	0.073	0.085	0.011	0.104			
	202	0.000	0.016	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000		0.031	0.021	0.066	0.073	0.000	0.000	0.021	0.042			
	204	0.070	0.052	0.110	0.078	0.146	0.073	0.011	0.064		0.005	0.010	0.015	0.026	0.083	0.000	0.011	0.010			
	206	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.007	0.021	0.000	0.000	0.000	0.010			
	208	0.065	0.057	0.037	0.010	0.000	0.083	0.085	0.032		0.010	0.000	0.015	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000			
	210	0.000	0.005	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000		0.021	0.021	0.022	0.021	0.000	0.000	0.011	0.052			
212	0.022	0.005	0.037	0.047	0.010	0.000	0.000	0.021	0.010	0.036	0.007	0.010	0.021	0.000	0.000	0.052					
214	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000					
216	0.005	0.000	0.029	0.000	0.000	0.031	0.011	0.000	0.005	0.005	0.007	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000					
220	0.005	0.005	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.032	0.000	0.000	0.007	0.010	0.000	0.106	0.000	0.010					
222	0.000	0.000	0.015	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031					
224	0.000	0.010	0.007	0.000	0.000	0.000	0.074	0.043	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000					
232	0.000	0.000	0.000	0.000	0.021	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000	0.010	0.000	0.000	0.000					
240	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000					
250	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000					

Appendix A (continued)

ヒラメ種苗の放流効果の増大を目指して

ヒラメサブチームリーダー
首藤宏幸*

Summary of studies done by the "Hirame" group with the aim of improving stocking effectiveness of Japanese flounder.

Hiroyuki SUDO*

1982年から1988年に実施された「マリンランティング計画」以降、ヒラメの栽培漁業展開のための基礎的研究は大きく進展し、天然および放流魚の生態に関して多くの知見が蓄積されてきた。ただし、その知見は成育場生活期のものに集中する傾向にあった。しかし、人工種苗の安定した資源添加効果を実現する栽培漁業システム構築のためには、ヒラメの全生活史にわたる知見の蓄積が必要である。そこで、第1期では、ヒラメ放流種苗の成育場における成長・生残を、摂餌と被食に重点をおいて定量化・モデル化するとともに、資源加入までの移動・生残の実態を追跡して、放流種苗の天然資源への寄与の程度の把握を目指した。同時に、これらの研究の基礎となるヒラメ野生集団の遺伝的構造や、生理生態特性の地域環境への適応様式の把握を試みた。具体的には、(1) ヒラメの遺伝的集団構造と地理的生理生態特性に関する研究として、DNA分析により韓国・中国を含む日本周辺のヒラメ天然稚魚の遺伝的集団構造を解明するとともに、耳石解析により孵化・着底日・成長速度の地理的変異を、RNA分析により性比の地理的変異を把握すること(2) 開放性海域におけるヒラメ放流魚の移動および産卵群への加入過程を定量的に評価するため、DNA分析により日本海沿岸の放流種苗の資源加入・産卵までの移動実態を定量的に把握すること(3) 閉鎖性海域におけるDNAマーカーによるヒラメ放流種苗の資源添加効果を分子遺伝学的に評価するため、DNA分析により放流前および放流後資源に加入するまでのヒラメ種苗の成長・生残を家系ごとに追跡すること(4) 天然ヒラメおよび放流種苗の生き残り資源への加入過程を解明するため、成育場におけるヒラメ放流種苗の捕食者を特定し、被食減耗の実態を天然ヒラメ稚魚と対比する形で定量的に把握すること(5) ヒラメ放流場の環境収容力に対応した適正放流手法を開発するため、成育場の環境収容力を定量的に評価する手法を確立し、適正放流量の推定が可能なヒラメ稚魚個体群モデルを開発することの5つの到達目標を掲げて研究を進めた。

個々の研究成果については以後の各論文で課題担当者が紹介するが、近年その技術的発展が著しい分子生物学的手法を導入することで、日本海の南北間で遺伝的に異なる二つの集団が存在すること、放流ヒラメの移動は1歳の秋以降盛んになるものの、多くの海域で、1、2歳魚を主体とする漁獲された放流魚の8割以上がその海域で放流されたヒラメで占められていること、ある程度の大きさまで成長した種苗の放流後の生残には家系間の違いはほとんど無いと考えられること等、多くの成果が得られた。また、放流種苗を捕食する可能性のある生物の胃内容物のミトコンドリアDNA分析および検鏡により、ヒラメ放流種苗の捕食者として、イシガニおよびオニオコゼ、ヒラメ1歳魚、イネゴチ、マゴチが特定され、放流後1週間に放流魚の4～6割がイシガニをはじめとする捕食者に食べられている実態が明らかにされた。さらに、ヒラメ稚魚個体群生産モデルの汎用性を整備することで、環境収容力の範囲内で最も効果の高い適性放流数を推定する手法を確立できた。

3年間の研究を進めるなかで、日本周辺海域の天然ヒラメ稚魚の遺伝的集団構造については、より細かいスケールでの異質性の検討とその生成要因の解明が必要であること、放流魚の家系ごとの資源加入および次世代への貢献度の

* 日本海区水産研究所 〒951-8121 新潟市水道町1丁目5939-22 (Japan Sea National Fisheries Research Institute, 1 Suido-cho, Niigata, Niigata 951-8121, Japan)

追跡は極めて難しく、今後も長期にわたる継続調査が必要であること、ヒラメの適正放流数を事前に精度高く推定するには、餌生物ごとの生産速度の把握と密度の予測が必要であること等、いくつかの解決すべき問題点も明らかとなった。しかし、以下の論文で紹介する第1期の成果を基礎として第2期の研究が展開されることにより、所期の目標である安定した資源添加効果を実現するヒラメ栽培漁業システム構築が進むものと期待している。

ヒラメの遺伝的集団構造と地域的生理生態特性に関する研究

中山耕至^{*1}・大河俊之^{*2}・丸川祐理子^{*3}・田結庄義博^{*1}・田中 克^{*1}

Studies on genetic population structure and ecological-physiological characteristics of local populations of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).

Kouji NAKAYAMA^{*1}, Toshiyuki OHKAWA^{*2}, Yuriko MARUKAWA^{*3},
Yoshihiro TAINOSHO^{*1} and Masaru TANAKA^{*1}

Abstract Genetic population structure and difference of growth rate and sex ratio between local populations in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were discussed. From mtDNA and microsatellite analyses, it was suggested that Japanese flounder from Japan Sea is not a single panmictic population. Mean growth rate of juveniles was higher in Niigata among five localities along East China Sea and Japan Sea. Sex ratios of juveniles from three localities along Japan Sea did not significantly deviated from 1:1.

Key words: Japanese flounder, population structure, microsatellite, growth rate, sex ratio

栽培漁業では大量の人工生産種苗を自然海域に放流するが、種苗の資質がその海域に生育する天然魚と大きく異なっていた場合、放流効果の低減のみならず天然資源への悪影響も懸念される。そのため、対象種野生集団の集団構造および各集団の生理生態特性は栽培漁業実施に不可欠な基本的情報となる。

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* は海産魚類を対象とした栽培漁業のモデル種であり、全国的に人工種苗の生産と放流が行われている。本種は北海道から九州、朝鮮半島、中国沿岸まで広域に分布する沿岸性底魚であり、各地の環境に適応的な生理生態的特徴をもつ地域集団が分化している可能性が強く推測される。Kinoshita *et al.* (2000) は日本海沿岸において計数形質の差異から南北2集団の存在を示唆しており、これは本種の地域的分化の一端を示していると考えられ

る。しかし、本種においては種苗生産技術および放流技術の知見蓄積が先行し、集団構造に関してはFujii and Nishida (1997) やSekino and Hara (2001) において検討されているものの未だ解明されていないところが多い。そこで、栽培プロ研第1期課題「ヒラメの遺伝的集団構造と地域的生理生態特性に関する研究」では、中立的分子マーカーを用いて日本周辺のヒラメ集団構造の推定を試み、同時に生理生態的特性の地域間比較を行った。中立的分子マーカーには集団構造分析に多用されるミトコンドリアDNAおよびマイクロサテライトDNAを、生理生態的形質としては成長率と性比をとりあげた。

2005年11月8日受理 (Received: November 8, 2005)

^{*1} 京都大学フィールド科学教育研究センター 〒606-8502 京都市左京区北白川追分町 (Field Science Education and Research Center, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo, Kyoto 606-8502, Japan)

^{*2} 高知県水産試験場 〒785-0167 高知県須崎市浦ノ内灰方1153-23 (Kochi Prefectural Fisheries Experimental Station, Uranouchi-Haigata 1153-23, Susaki, Kochi 785-0167, Japan)

^{*3} 味の素株式会社 〒530-0005 大阪市北区中之島6-2-57 (Ajinomoto Co. Ltd., Nakanoshima 6-2-57, Kita, Osaka 530-0005, Japan)

中立マーカーによる集団構造分析

ヒラメの遺伝的集団構造を概観するため、最初に日本各地の10地点から採集された稚魚206個体について、ミトコンドリアDNA調節領域前半約310塩基対の配列を決定した。その結果、ハプロタイプ多様度からみた本種の遺伝的多様性は高いが、固定指数 F_{st} 等で示される地域集団間の異質性は一部を除いて有意ではなく、全体に遺伝的分化の度合いは大きくないことが示された。次いで、より小さいレベルでの分化を検出するため、

対象を日本海沿岸の3地点に絞り、多くの個体数を用いた分析を試みた。手法は複数の遺伝子座を調べることができるマイクロサテライトDNA分析とした。まずヒラメゲノミックライブラリーを用いてマイクロサテライト座の探索を行い、良好なPCR増幅を示す6座のプライマーを開発した。これら6座のアリル数は2–44個、ヘテロ接合度は0.222–0.876であり、変異性の程度は多様であった。2000年に日本海南部から山口産($n=148$)、中部から京都産($n=226$)、北部から青森産($n=110$)のそれぞれ着底稚魚を採集し、上記6座

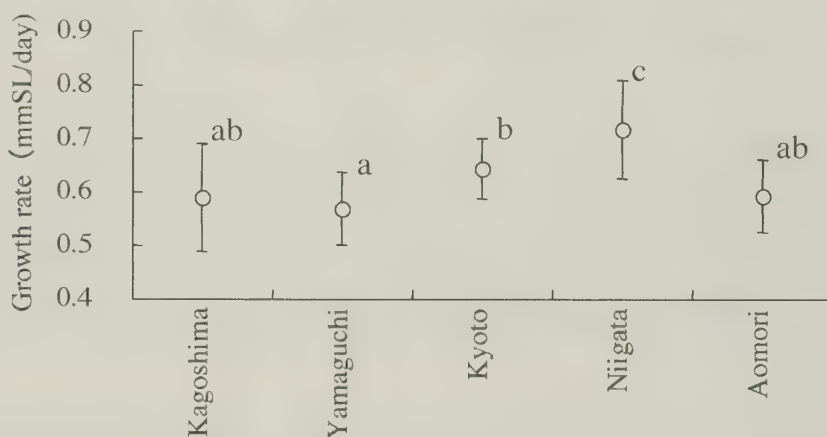


Fig. 2. Mean growth rate of juvenile Japanese flounder from five localities along East China Sea and Japan Sea. Vertical bars represent standard deviation. Groups with the same letter were not significantly different (ANOVA).

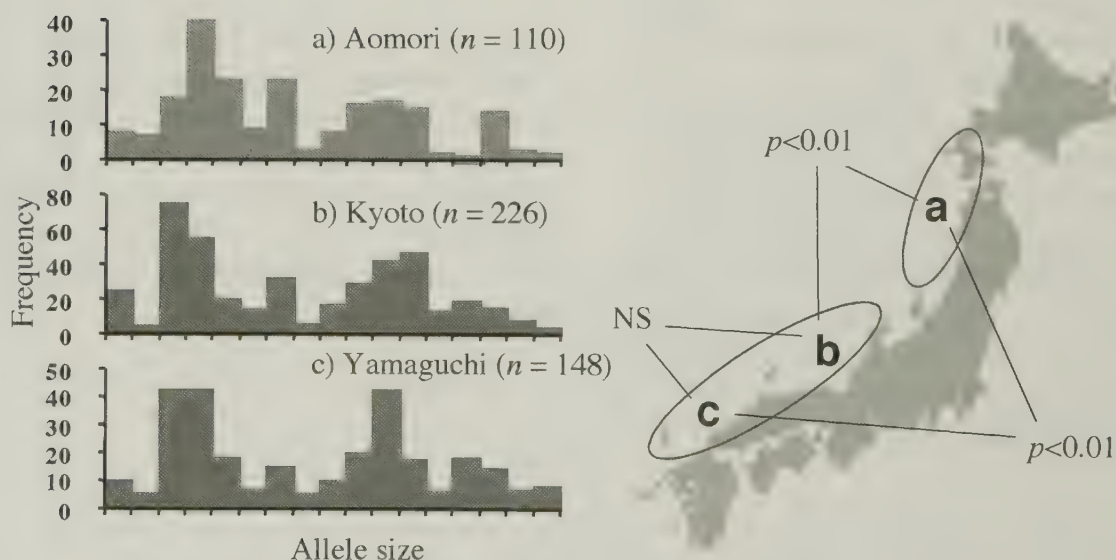


Fig. 1. Allelic frequencies of microsatellite locus PoGT17 of juvenile Japanese flounder from three localities along Japan Sea (Modified from Ohkawa *et al.*, submitted).

の分析を行ったところ、PoGT17座においてアリル頻度の異質性が認められ、山口・京都群と青森群との間での遺伝的分化が示された (Fig. 1)。京都では早期に着底するグループと後期に着底するグループの2群が存在することが知られており、前者は浮遊期に西方から輸送されてくるもの、後者は地先産卵群に由来するものと考えられている (前田, 2002)。本研究で用いた2000年の京都産サンプルは体長組成から大部分が早期着底群に属すると推定され、このため山口サンプルと京都サンプルの間では異質性が認められなかったと考えられる。

成長速度の地域間変異

中立マーカーによる集団構造分析と平行して、各地域のヒラメ野生集団間に生理生態的特性の違いが認められるかどうかを調べた。地域間で選択圧が大きく異なるような場合、適応的形質は中立マーカーよりも鋭敏に集団分化をあらわす可能性がある。また、個々の地域集団の特性を把握することは放流効果の高い人工種苗の生産に大きく貢献すると考えられる。

1997年に鹿児島から青森までの東シナ海-日本海沿岸の5地点で採集されたヒラメ稚魚を用い、耳石 (扁平石、礫石) 輪紋より日齢を推定し、孵化から採集時までの平均日間成長率を求めた。その結果、新潟産サンプルにおいては、他地点よりも良好な成長が認められた (Fig. 2)。さらに、耳石上に生じる着底マークを手がかりとし、浮遊期と着底後のそれぞれの期間に分けて日間成長率を求めたところ、着底後だけではなく浮遊期においても成長速度に地域差があらわれていることが確認された。

性 比

ヒラメは基本的には雄XY-雌XX型の性決定様式をもつが、着底期の水温によっては遺伝的に雌の個体が機能的には雄となる、性分化転換を起こすことが飼育実験によって確かめられている (Tabata, 1991; Yamamoto, 1999)。本種の産卵期は九州南部では早春、北海道では初夏であり (南, 1997)、地域間で性分化期に経験する水温に大きな違いがある。したがって、もし野生集団においても水温による性分化転換が生じるのであれば、地域間で異なる性比を示す可能性が考えられる。

2000年ないし2003年に日本海側の3地点 (長崎、鳥取、青森) で採集された稚魚を対象とし、機能的性の判別を行った。全長50mm以上の個体では、生殖腺の組織切片を作成し、卵巢腔が観察されるものを雌とした。全長50mm未満の個体では卵巢腔が明瞭でない場合が多いため、北野ら (2000) の方法にしたがい、RT-PCR法によって生殖腺にアロマターゼmRNAの発現が認められる個体を雌とした (Fig. 3)。

その結果、各地点で採集された稚魚の性比は1対1から有意にずれておらず、また地点間での性比の差も認められなかった。しかし、各地点のサンプルを全長組成から大サイズ群と小サイズ群に2分したところ、各地点とも小サイズ群で雌が少ない傾向が確認された。小サイズ群は大サイズ群より着底時期が遅く、性分化期の経験水温もより高いと推定されるため、この結果は野生集団における性分化転換の可能性を示唆すると考えられる。地域により性分化時期の水温が異なるにもかかわらず性比に大きな差異が認められなかったことについては、性分化転換を引き起こす水温が地域集団間で異なるなど、何らかの適応的機構が関わっているのかもしれない。

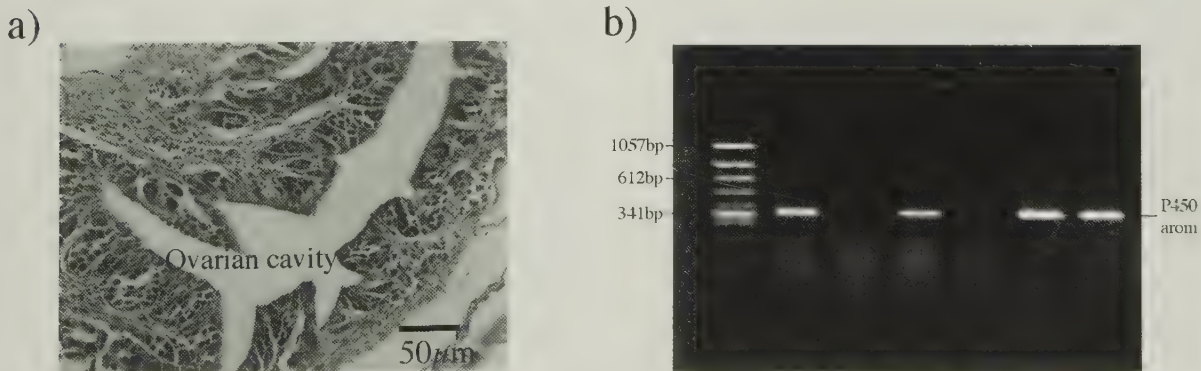


Fig. 3. a) A picture of section of juvenile Japanese flounder gonad. b) An example of RT-PCR for aromatase mRNA on juvenile Japanese flounder gonad. PCR positives were judged females.

まとめ、今後の課題

中立的分子マーカーを用いた分析からは、日本周辺の各地点間では全体的に遺伝的分化の度合いが小さいことが示されたが、適切なマーカーを探索することで日本海沿岸に少なくとも2つの集団が存在することを確認できた。さらに、成長率および性比の地域間比較からは、適応に関わる形質については中立マーカーから認識されるよりも細かい地理的レベルでの分化が生じている可能性が示された。しかし、それら適応に関わる形質での地域間差異が遺伝的な基盤を持つものであるかどうかは確認されておらず、今後、共通の環境条件下での飼育実験を行うなどして検証する必要がある。また、ヒラメの分布域のなかで日本の太平洋岸、朝鮮半島・中国沿岸などについては稚魚サンプルの採集が困難なため未だ分析が十分ではなく、これからの課題として残っている。

文 献

- Fujii T. and Nishida M., 1997: High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **63**, 906-910.
- Kinoshita I., Seikai T., Tanaka M., and Kuwamura K., 2000: Geographic variations in dorsal and anal ray counts of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, in the Japan Sea. *Environ. Biol. Fish.*, **57**, 307-315.
- 北野 健, 山本栄一, 高宗和史, 安部眞一, 2000: アロマターゼmRNAの検出によるヒラメ人工種苗の早期性判別について. 日水誌, **66**, 300-301.
- 前田経雄, 2002: 若狭湾西部海域におけるヒラメ仔稚魚の加入機構に関する研究. 学位論文, 京都大学農学研究科.
- 南 卓志, 1997: 生活史特性, 「ヒラメの生物学と資源培養」(南 卓志, 田中 克編), 恒星社厚生閣, 東京, pp.9-24.
- Ohkawa T., Tanaka Y., Nakayama K., Nishida M., and Tanaka M., submitted: Genetic heterogeneity of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the Sea of Japan using microsatellite analysis.
- Sekino M. and Hara M., 2001: Application of microsatellite markers to population genetic studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 572-589.
- Tabata K., 1991: Induction of gynogenetic diploid males and presumption of sex determination mechanisms in the hirame *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **57**, 845-850.
- Yamamoto E., 1999: Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **173**, 235-246.

開放性海域におけるヒラメ放流魚の移動および産卵群への 加入過程の定量的評価

藤井徹生*

Migration of released hatchery-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* along the Sea of Japan

Tetsuo FUJII*

Abstract A method of tracking released Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* was developed. The mitochondrial DNA of the Japanese flounder is characterized by the extremely high sequence variability especially in the control region. In this method, sequences of hatchery-reared juveniles should be analyzed first. The sequence data are then registered in a database, so that when the flounder later caught, where they originally been produced can be determined. Results from mtDNA tag showed that released Japanese flounder began to migrate in their second winter mainly against Tsushima current, which streams from southwest to northeast. Some of them migrated more than 300km and flounder from several hatcheries were recaptured together. The mitochondrial DNA tag is useful not only for the elucidation of the migration but also for the monitoring of the genetic diversity.

Key words: Japanese flounder, mtDNA tag, migration,

ヒラメの種苗放流事業は1970年代に始まった。放流量は1980年代にはいって急激に増加し、近年は全国で年間2,500万尾の種苗が放流されている。放流技術の進歩により回収率（漁獲尾数／放流尾数）が30%を上回る事例も報告されるようになり、海域によっては混獲率（漁獲物中に放流魚が占める割合）が50%近くに達している。回収率や混獲率で示される数値はいわば直接的な放流効果であるが、間接的な放流効果として放流魚の再生産への貢献が考えられる。放流魚が再生産に大きく貢献していれば種苗放流を行わない場合に較べて次世代以降にわたって資源が上積みされることが期待できるが、その反面、種苗放流が天然集団におよぼす遺伝的な影響が懸念される。本研究では分子生物学的な手法を用いてヒラメ放流魚がどの程度再生産に貢献しているかを明らかにし、次世代以降の資源に放

流魚由来のヒラメが占める割合や種苗放流が天然集団におよぼす遺伝的な影響を評価することを最終的な目的とする。そのためにはまず、産卵親魚群にどのような遺伝的特性をもった放流魚がどれくらい加入しているかを把握する必要がある。そこで第1期では日本海沿岸を調査海域として、ヒラメ放流魚の移動および産卵群への加入過程を定量的に評価することを目的とした。

DNA標識について

主に天然ヒラメの標識放流・再捕調査の結果から、ヒラメは時には府県境を越えて数百kmにも及ぶ移動をすることが知られているが、それらの調査結果の多くは定性的であり定量的な結果はほとんど得られていないのが現状である。放流ヒラメについては無眼側の色



Fig. 1. Typical abnormal pigmentation found on the blind side of the hatchery-reared Japanese flounder. (Upper fish. Lower fish is a wild one.)

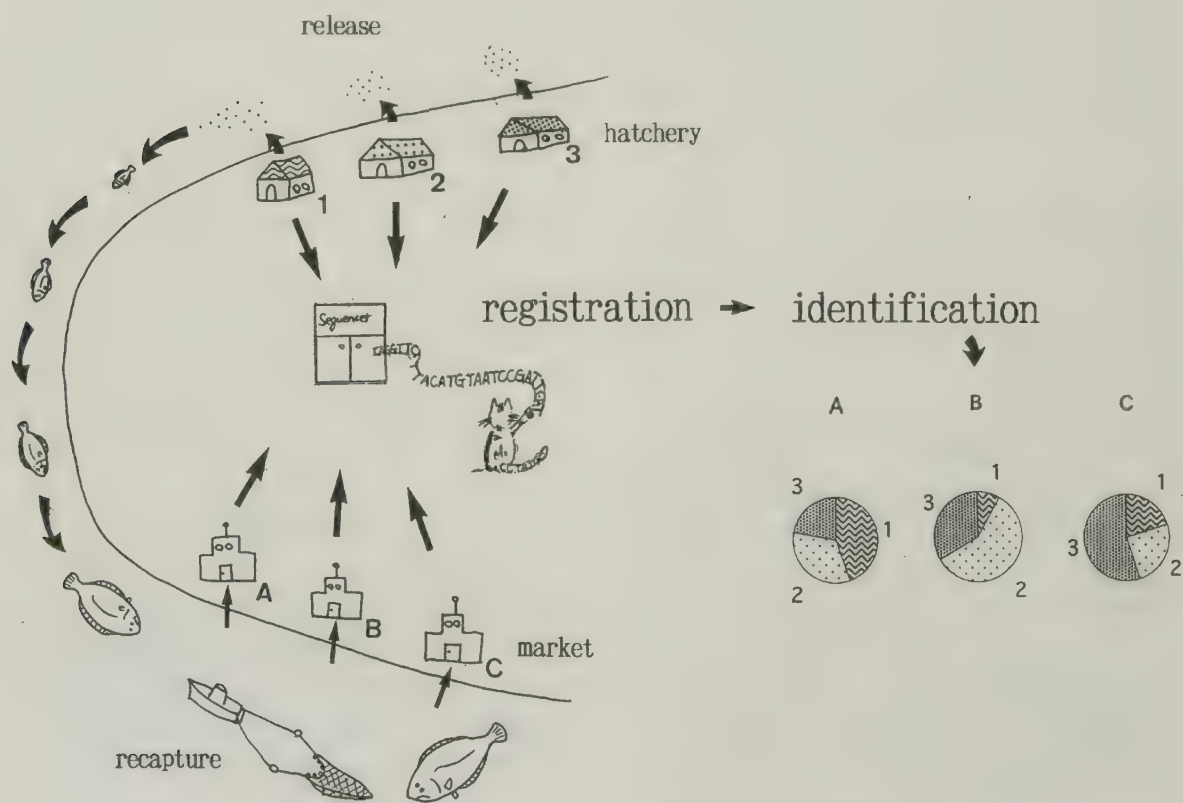


Fig. 2. Concept of a mitochondrial DNA tag.

素異常 (Fig. 1) を指標に放流効果の調査が行われてきたが、この方法ではどこで放流されたものであるかはわからない。従来の標識を放流種苗に装着するには脱落、稚魚への負担、手間、発見率、コスト等の問題があり、その移動の実態解明の障壁となってきた。そこで、本研究ではミトコンドリアDNA (mtDNA) の塩基配列の変異を標識にして放流ヒラメの由来を明らかにすることを試みた。

この手法は放流種苗のミトコンドリアDNA (mtDNA) の調節領域と呼ばれる部分の塩基配列を放流する前に分析しておき、漁獲された放流魚 (無眼側に体色異常のあるヒラメ) のそれと照合してどこで生産、放流されたものであるかを明らかにするものである (Fig. 2)。

ミトコンドリアDNAは核DNAの約10倍の進化速度があるといわれているが、中でも調節領域は変異に富んでおり、天然ヒラメではほとんど個体ごとに塩基配列が異なるくらいの高い変異性が報告されている (Fujii and Nishida, 1997)。種苗生産施設の親魚も元を正せば天然魚であるから種苗生産施設ごとに異なったタイプのmtDNAを持つ親魚があり、当然種苗のmtDNAの型も施設ごとに異なると考えられる。このことがmtDNA分析による漁獲された放流魚の由来の特定を可能にするのである。この手法には以下のような利点がある。まず、mtDNA分析はごく少量の試料からも可能であり、試料の鮮度もあまり問題にならない。つまり鱗1枚やヒレの先端からでも分析できるため、魚体を買上げる必要がない。もちろん脱落や変質の心配がなく、個体ごとの情報を得ることができる。さらには種苗や再捕された放流魚の遺伝的多様性に関する情報も得ることができる。1検体分析するのにかかる試薬・消耗品代は筋肉組織からで400円、鱗からでは800円程度であり、週に200個体程度の分析が可能である (Fujii, 2003)。

放流種苗の分析結果

日本海沿岸14カ所の種苗生産施設で生産されたヒラメ人工種苗59生産群2,110個体および親魚11群648個体のmtDNA調節領域前半部分375塩基対の塩基配列分析を行い、出現した塩基配列のタイプ (ハプロタイプ) を明らかにした。検出したハプロタイプはDNASIS® Pro (日立ソフト) を用いてパソコン上のデータベースに登録した。また、各府県の年度ごとの種苗生産および放流記録から各生産群の放流海域を把握した。

日本海北部においては生産施設ごとに異なったハプロタイプを持つ種苗が生産されており、DNA分析によ

り種苗の由来が明らかにできることが確認されたが、西部では一部の隣接する施設で同じ親魚群に由来する魚を親魚として養成していたり、卵をやりとりした例があり、これらの種苗の生産施設をDNA分析により特定することは現状では不可能であった。

ヒラメ種苗の分析により検出されたハプロタイプの数は親魚の数よりも親魚の由来 (天然親魚か養成親魚か) に依存し、天然親魚から生産された種苗では1群あたり5~18のハプロタイプが検出されたのに対し、養成親魚から生産された種苗では1~4のハプロタイプしか検出されなかった。ハプロタイプの頻度の偏りの指標になるハプロタイプ多様度も同様に親魚の数よりも親魚の由来に依存し、天然親魚から生産された種苗では0.62~0.91であったのに対し、養成親魚から生産された種苗では0~0.66であった。ハプロタイプ多様度が0 (つまり、ひとつのハプロタイプしか検出されなかった) であった生産群は2カ所の種苗生産施設で認められた。いずれも経代飼育した養成親魚を用いている施設であり、親魚の早急な入れ替えが必要であると考えられる。

再捕された放流ヒラメの分析結果

日本海沿岸各地で漁獲された無眼側に体色異常のあるヒラメ (放流魚とみなされている) 2760個体のmtDNA塩基配列分析を行い、放流種苗のデータベースと照合して生産された施設およびおおよその放流海域を特定した。漁獲された放流魚の約70%は全長40cm以下の1, 2歳魚で、多くの海域においては漁獲された放流魚の80%以上をその海域で放流されたヒラメが占めていた。この傾向は成熟サイズにあたる全長40cm以上のヒラメにおいても同様であり、放流ヒラメの移動は当初予想されていたよりも小さいと考えられる。

隣接する府県で放流されたヒラメが漁獲物に占める割合は晩秋から冬にかけて増加し、日本海西部では全長40cm以上、北部では35cm以上の個体においてその傾向が顕著であった。このサイズは1歳魚に相当し、放流ヒラメの移動は1歳魚以上、季節としては晩秋から冬にかけて活発になると推察された。この結果は従来の標識放流・再捕調査の結果と一致した。

長距離移動の例としては山形産のヒラメが富山湾東部で、石川産のヒラメが鳥取県で、京都産のヒラメが島根県で漁獲された例があり、対馬海流の上流方向に向かう移動が際立った。一方、島根産のヒラメが若狭湾西部で漁獲された例も4例あった。また、能登半島を越える移動については、能登半島東岸で漁獲された放流魚306個体中に富山産のヒラメが2個体 (0.82%)、

北岸の283個体中に富山産が4個体(1.4%)および福井産が9個体(3.2%)、西岸の455個体中に福井産のものが10個体(2.2%)みられた。従来の標識放流・再捕調査の結果と同様に能登半島を越えて移動した個体は認められず、能登半島北岸の輪島では富山産、福井産の放流ヒラメがともに漁獲されていた。

生産施設を特定できなかった個体に関してはその原因を検討した。原因の一つとして考えられるのはデータベースの不備である。特に3歳以上の高齢魚については本研究の開始前に放流されたものが多く、放流後からデータベース作成開始の間に親魚の入れ替えがあった場合には生産施設を特定できない。また、若齢魚の生産施設を特定できない原因としては無眼側に体色異常のある天然魚の存在が考えられる。生産施設を特定できなかった個体は体色異常の軽微なものが多く、mtDNAの多様性の指標であるハプロタイプ多様度が天然魚並みに高いことから、それらの多くは何らかの理由で無眼側の体色に異常をきたした天然魚であると推察した。

定量的評価と第2期への展望

本研究で分析した2,760個体のうち1,455個体は若狭湾西岸(京都府)から能登半島西岸(石川県)において漁獲された放流ヒラメであった。非常にデータの充実したこの海域において、全長別に放流ヒラメの移動を検討した。若狭湾央以外の3海域においては漁獲された放流魚の約90%以上を自府県で放流されたもの(自府県産と呼ぶ)が占めていた。他府県産のヒラメ割合は全長40cm以上で高くなる傾向があったが、全長50cm以上でも71%(若狭湾東岸)から93%(能登半島西岸)を自府県産のものが占めた。若狭湾央で漁獲された放流ヒラメは、京都府沿岸からも福井県沿岸からもほぼ等距離にあるという地理的な特徴を反映して、福井産のヒラメと京都産のヒラメの割合が拮抗した。従来、ヒラメは成長に伴って海流の上流(日本海西部では西)へ移動すると考えられていたが、漁獲された放

流ヒラメに石川産のヒラメの占める割合は若狭湾央9.5%、若狭湾東岸2.2%、若狭湾西岸では0.46%(全長40cm以上のものに限るとそれぞれ8.9%, 8.7%, 0%)にとどまった。また、福井産のヒラメが若狭湾西岸で漁獲された放流ヒラメに占める割合は3.6%(全長40cm以上で8.8%)であった。以上のように放流ヒラメの移動は従来考えられていたよりも小さく、海域間の漁獲量や混獲率の違いを勘案すると石川県および福井県の場合は放流したヒラメの80%以上は自県内で漁獲されていると推察された。

ヒラメの成熟サイズは♂35cm♀40cm前後と考えられている。若狭湾央で漁獲される成熟サイズのヒラメに放流魚が占める割合は8%前後であり、この群が若狭湾におけるヒラメの産卵群を代表すると仮定すると、放流ヒラメの個体数レベルでの再生産への貢献度は福井産4%、京都産3%、石川産1%程度であると推察された。

また、放流ヒラメの再生産への貢献を把握するための基礎資料として、漁獲された放流魚のうち性別の明らかになった1450個体の性比に検討を加えたところ、その性比は天然集団と同様にほぼ1:1で、種苗放流が天然集団の性比に与える影響は小さいと判断した。

第Ⅱ期は、これらの結果をベースに若狭湾沿岸を調査海域として放流ヒラメの再生産への貢献を評価する計画である。

文 献

- Fujii T. and Nishida M., 1997: High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **63**, 906-910.
- Fujii T., 2003: Tracking released Japanese flounder by mitochondrial DNA sequencing. *Proceedings of the thirtieth U.S.-Japan meeting on aquaculture*, 51-53.

Genetic profiling of hatchery-raised Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on DNA markers: an efficient means to track released flounder^{*1}

Masashi SEKINO^{*2}

Abstract This paper illustrates the efficiency of genetic profiling approach to determine a hatchery strain of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*, which was stocked into a natural sea area in a practical stock enhancement program. The hatchery strain tracked in this study was founded by using 18 wild captives in a hatchery station (JASFA hatchery), and the pedigrees of these offspring were identified by means of microsatellite DNA technique. In September 2001, the hatchery-raised fish (JASFA fish) were stocked into Miyako bay (Iwate Prefecture), and at around the same time and within the same area, a different hatchery strain was released by another hatchery station. In this study, microsatellites together with nucleotide sequences of the mitochondrial DNA control region were used as genetic tags to track the released JASFA fish. A total of 1,576 individuals including both wild and released fish were entrapped in a set net during a six month period one year after the release. Of these, 35 fish were retrieved as survivors of the released JASFA fish with the use of the two classes of molecular marker. The results presented here show that the genetic profiling would be of great use to further our understanding of stocking effects in Japanese flounder.

Key words: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), stock enhancement, microsatellites, mitochondrial DNA, parentage.

Stocking of hatchery-raised fish into natural environments has widely been acknowledged as an intuitive approach to enhance the exploitable resources, and also this approach offers a possible way to recover threatened or endangered aquatic organisms (Allendorf and Ryman, 1987). As stocking practices have intensively been carried out in many fishery species, a focus of attention from the viewpoints of biology, ecology, and genetics has been paid to the extent of stocking impacts upon indigenous populations in the sense of both positive and negative effects (FAO, 1993; Schramm and

Piper, 1995). Besides utmost concern is essential regarding stocking impact in the context of conservation biology, a balance between cost and benefit associated with hatchery practices should also be investigated in order to further our comprehensive understanding of stocking effects (White *et al.*, 1995; Svåsand *et al.*, 2000; Mustafa *et al.*, 2003); a necessary step towards tackling this challenging subject is to trace the fate of released fish.

Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* is one of the species for which stocking practices have intensively been made throughout Japa-

2005年11月8日受理 (Received: November 8, 2005)

^{*1} Sekino *et al.* (2003) および Sekino *et al.* (2005) (掲載するに際し投稿規定に沿って修正した)

^{*2} 東北区水産研究所 〒985-0001 宮城県塩釜市新浜町3-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Fisheries Research Agency, Shin-hama, Shiogama, Miyagi, 985-0001, Japan)

nese coastal areas to increase the harvest yield (Furusawa, 1997). Hatchery-raised flounder commonly exhibit hyper-melanic phenomenon on the blind body side (Haga *et al.*, 2004 and references therein), and thereby it is less complicated compared with other species to track released fish since such abnormal pigmentation serves as an indicator to discriminate released fish from wild ones (Seikai, 1997; Iwamoto *et al.*, 1998). Using hypermelanosis alone as a tracer of released flounder, however, encounters several constraints. For example, when two or more hatcheries release seedlings within neighboring sea areas, how can we assign a recaptured fish to the hatchery of origin? Such information is crucial for appropriate hatchery management decisions concerning budget, space, and labor capacity that are optimal for each hatchery. Tracking released fish using external tagging method entails the risk of loss or under-detection of tags, and this method is not suitable for the application to juvenile fish with handling vulnerability. Tagging with chemical compounds such as alizarin complexone (Blom *et al.*, 1994) also has disadvantages as this method requires much experience to determine tagged fish accurately, and furthermore, it is not possible to assign a tagged fish to the source hatchery if other hatcheries employ this method in a similar manner.

The genetic profiling approach can be used as an alternative tagging method to overcome several constraints involved in the traditional tagging methods. There have been many studies to establish pedigrees of aquaculture species in mixed family tanks through accurate parentage determination, where microsatellite DNA loci have preferably been adopted as a genetic tag (Herbinger *et al.*, 1995; O'Reilly *et al.*, 1998; Herbinger *et al.*, 1999; Perez-Enriquez and Taniguchi, 1999; Perez-Enriquez *et al.*, 1999; Norris *et al.*, 2000; Huvet *et al.*, 2001; Selvamani *et al.*, 2001; Boudry *et al.*, 2002; Rodzen *et al.*, 2004), and as well in Japanese flounder (Hara

and Sekino, 2003). It is expected that parental allocation based on genetic profiles would theoretically be applicable to trace released flounder back to the source hatchery even though several hatcheries practiced stocking of flounder at around the same time and within the same area. Another important asset of this approach is that this method would allow analysis of the family survival performance of released fish under natural environmental conditions.

This paper demonstrates an application of parental allocation in direct tracking of released flounder. The hatchery strain screened in this study was created by using 18 wild captives (12 females and 6 males). First, the pedigrees of this strain in a mixed family tank, which was to be released into a natural sea area, were determined with the use of 4 microsatellite markers. The data from individual microsatellite genotypes together with the nucleotide sequence variation of mitochondrial DNA (mtDNA) control region were then used to assign the released fish back to the hatchery of origin.

Materials and methods

Determination of parent-offspring lines based on microsatellite data

Hatchery production of Japanese flounder was initiated in May 2001 at the Miyako Hatchery Station of the Japan Sea-Farming Association (JASFA hatchery)*¹. A total of 18 fish including 12 ripe females (FM#1–#12) and six ripe males (M#1–#6), which were wild captives caught in Miyako Bay (142 °E, 40 °N), were allowed to spawn in a spawning tank. Sexual maturity and the health condition of these fish were examined through the hatchery operation prior to the mating event, and all fish were regarded to be in suitable condition for reproduction. Approximately one million eggs were produced during one night (24 May) without the aid of artificial stripping, and the eggs were

*¹Present organizational name: Miyako Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency.

transported to a 0.5 ton incubation tank. The hatching success of eggs was estimated by counting the number of eggs and larvae per unit volume (volume cubic method), and it turned out that almost all of the collected eggs successfully hatched out (*i.e.*, approximately 100% success of fertilization and hatching), out of which 600,000 F₁ offspring were randomly collected and communally reared in a 50 ton tank for four months. Samples of offspring for pedigree reconstruction were collected at three stages during the rearing period. A random sample of 113 larvae was collected within 24 hours after hatching (sample abbreviation: OP 0), and 216 fish were randomly collected at the age of one month (sample abbreviation: OP 1). A further 407 fish were sampled at four months of age (abbr. OP 4) which was timed with the stocking practice, and this sample was size-sorted: just before the stocking event, 207 individuals were sampled from the fish that were selected for the release (total length, 53.8–97.2 mm; mean $\pm$ s.d. 78.0 ± 7.3 mm).

Genomic DNA was extracted from a blood sample of each candidate broodstock parents, and from a fin clip or muscle tissue of each F₁ offspring following Sambrook *et al.* (1989). Four microsatellites (*Po1*, *Po13*, *Po42*, and *Po91*; Sekino and Hara, 2000), for which the Mendelian segregation was verified using several parent-offspring lines (Sekino and Hara, 2001a), were profiled for all fish samples. Polymerase chain reaction (PCR) to amplify each of the four loci was carried out in a 15 μ L reaction mixture, which included 10–20 pmols of each primer set, 100 μ M of dNTPs, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 0.3 units of AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and approximately 50 ng of template DNA using PC-960G gradient thermal cycler (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) or GeneAmp system 9600 (Applied Biosystems). PCR cycling parameters were as follows: 12 min at 94°C, 30–40 cycles of 30 sec at 94°C, 1 min at a primer-specific annealing temperature, 1 min at 72°C, and final elonga-

tion for 5 min at 72°C. The specific annealing temperature of each primer set is available in the previous report (Sekino and Hara, 2000). Polymorphism screening and allele designation were conducted as described elsewhere (Sekino and Hara, 2001b). Once the microsatellite genotypes of all candidate broodstock parents and offspring were profiled, each offspring was assigned to its possible parents. Parent-offspring lines were determined by looking at whether the candidate parents would exactly generate the offspring's genotypes for each locus. A simulated parental allocation analysis based on the Monte-Carlo simulation method was employed using the PAPA version 1.1 software package (Duchesne *et al.*, 2002). This analysis was made in order to ensure the accuracy of parentage determination based on the four microsatellites, and to assess how many numbers of loci would be required for successful parentage assignment. The parental simulation option both under the sexed parents condition (sex of each parent is known) and the non-sexed parents condition (sexes are unknown) was adopted, through which a number of putative offspring's genotypes are generated from possible parental combinations with iterations. The program outputs the results as values for several random variables associated with the accuracy of parentage allocation (*e.g.*, proportion of offspring with correctly allocated parental pairs, for details, see Duchesne *et al.*, 2002) for each locus or various locus combinations. The simulation was done with 1,000 iterations in which 10,000 pseudo-offspring were generated at each iteration.

Assignment of recaptured hatchery-raised fish to the hatchery of origin

At four months of age, the offspring were size-sorted for larger size in total length through a routine hatchery operation. A total of 60,000 fish (JASFA fish) were tagged with alizarin complexone (ALC) and stocked into Miyako Bay on 10 September 2001. Around the same time that the JASFA hatchery stocked the flounder seedlings, 90,000 flounder juveniles

derived from a different hatchery strain were also stocked into the same bay by another hatchery (Iwate Prefectural Stock Enhancement Center) without external or chemical (ALC) tagging operations. Unfortunately, neither the historical records of the hatchery production nor genetic information of the latter strain is available; for this reason, this study was confined to track the released JASFA fish.

One year after the stocking event, a set net was placed in Miyako Bay from September 2002 to February 2003 (6 months), during which a total of 1,576 individuals including both wild and released fish were collected. Based on the empirical observations of the growth rate of Japanese flounder distributed in Miyako Bay, individuals ranging from approximately 18 to 34 cm in total length were sorted as 2001-year-class flounder. Of these, individuals showing hypermelanosis on their blind body side were further selected as a sample of recaptured hatchery-raised fish (149 fish), which was expected to be a mix of fish originating from the two unrelated hatchery strains, and consequently the 149 recaptures were subjected to microsatellite and mtDNA sequencing analysis. Again, this study focused on tracking 2001-year-class (1+) JASFA fish (1+ JASFA fish).

All the 149 recaptures were screened with the four microsatellites in the same manner as described above. In addition to the microsatellite analysis, approximately 435bp segment of Japanese flounder mtDNA including the tRNA^{Pro} gene (71bp) and the left domain of control region was sequenced for the recaptures together with the 18 JASFA broodstock parents, and the identity of mtDNA haplotype between each recaptured fish and JASFA broodstock parent was surveyed. A mtDNA identity although provides information to infer the female parent alone due to the general maternal transmission of the mtDNA genome (Avisé *et al.*, 1987), it was expected that knowledge of maternal lineages of the recaptures would strengthen the accuracy of the microsatellite-based parental allocation. Given the fact that a large amount of nucleotide variations are

harbored in the Japanese flounder mtDNA control region (Fujii and Nishida, 1997; Sekino *et al.*, 2002; Sekino, 2004), the author considered that all the JASFA broodstock female parents would have different haplotypes from each other. Details of the PCR primer pair to amplify the target region and the PCR profiles are available in Sekino *et al.* (2002). After PCR amplification, leftover dNTPs and primers in the reaction solution were digested by combinational use of exonuclease I and shrimp alkaline phosphatase (ExoSAP-IT Kit, Amersham Bioscience, Piscataway, NJ, USA). Sequencing analysis of PCR products was conducted using BigDye v3.1 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in combination with the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Sequences were determined from both directions, and sequence alignment was made with the DNASIS PRO version 2.2 software (Hitachi, Tokyo, Japan).

Results

Pedigree tracing in a mixed family tank

Allelic variations of the four loci proved to be extensive in the 18 potential broodstock parents (Table 1), and the number of alleles varied depending on the locus (minimum 13 at the *Po42* locus, maximum 19 at the *Po91* locus). Unique alleles, alleles unique to just one individual, were detected for all loci. At three loci (*Po1*, *Po13*, and *Po91*), the number of unique alleles was more than a half of the total number of detected alleles. Expressing these results in another manner revealed that 15 of the 18 broodstock had unique alleles for at least one locus. These unique alleles were an efficient indicator to trace pedigrees. The results of the simulated allocation analysis in terms of the values for random variables associated with the accuracy of parental allocation are shown in Table 2. Under the situation that the sexes of all the 18 parents were known (i.e., under the actual situation), a successful parentage allocation (99.9%) with negligible probability of

Table 1. Genotypes of 4 microsatellites^{*1} determined for the 18 candidate broodstock

Candidate broodstock		Genotypes			
Males	TL(cm) ^{*2}	<i>Po1</i>	<i>Po13</i>	<i>Po42</i>	<i>Po91</i>
M#1	50.0	162/196	208/214	172/174	148/156
M#2	49.5	162/180	224/234*	174/236*	156/158
M#3	43.6	198*/222*	212/228*	178/182	160/160
M#4	42.7	164/188	208/210*	178/194*	160/170*
M#5	38.2	162/164	218/232	172/192*	150/160
M#6	45.9	162/162	214/216	172/182	162/166*
Females					
FM#1	53.2	164/208*	232/238*	172/178	160/222*
FM#2	49.5	162/186*	216/236*	172/178	156/182*
FM#3	54.6	162/162	212/216	182/190	162/198*
FM#4	53.8	180/206*	208/212	172/180	190*/194
FM#5	51.0	184/188	208/216	172/176	148/148
FM#6	50.0	162/178*	216/260	172/172	150/194
FM#7	51.7	162/184	216/242*	180/196*	160/176
FM#8	50.5	190/204*	220*/250*	190/190	162/164*
FM#9	54.3	164/196	208/218	176/202*	150/178*
FM#10	50.0	162/162	208/212	176/180	156/156
FM#11	48.0	190/194*	208/212	186/186	146*/184*
FM#12	48.0	162/188	216/224	178/178	154*/158
No. of alleles		15	16	13	19
No. of unique alleles		8	9	5	11

Unique alleles, alleles unique to one individual, are denoted on the individual genotypes by adding an asterisk.
^{*1}GenBank Accession Number: *Po1*, AB046745; *Po13*, AB046746; *Po42*, AB046754; *Po91*, AB046761.
^{*2} Total length

failed allocation was achieved by the use of all the four loci. Combinations of three loci could also give rise to a relatively high parentage resolution as approximately 95-99% offspring were correctly assigned to a single parental couple. Using one or two loci however resulted in a poor parentage resolution except for one instance: a combination of *Po13* and *Po91* loci produced a high level of parentage assignment success with a little probability of allocation failure. As was expected, parental allocation performance would overall be depressed if the sexes of the broodstock parents were unknown, as a 4 % probability of failed allocation was yielded even though all the four loci were used.

All the offspring samples were successfully assigned back to a single parental couple. A total of nine families were identified across the three samples (OP 0, OP 1, and OP 4; Table 3), and there was an apparent difference of family size among the families. It turned out that six families were attributable to one male (M#2): more than 99% offspring were sired by male M# 2, and two other males (M# 1 and # 6) sired a very few offspring. Three males (M#3, # 4, and # 5) and six females (FM# 1, # 2, # 3, # 5, # 6, and # 8) did not contribute to the next generation.

Significant difference of the proportion of family size between samples was observed in

Table 2. Values for random variables associated with the accuracy of microsatellite-based likelihood parental allocation method estimated based on Monte Carlo simulation ^{*1}

Locus combinations	Sexed condition ^{*2}		Non-sexed condition ^{*3}				
	Correct allocation		Failed allocation ^{*4}		Correct allocation		
	Female parents		Male parent		parental couple		Failed allocation
	Correct allocation	Ambiguity	Correct allocation	Ambiguity	Two parents	One parent	
1 locus	<i>Po1</i>	0.2293(0.0039)	0.1688(0.0036)	0.1668(0.0036)	0.7707(0.0039)	0.0000(0.0000)	0.0000(0.0000)
	<i>Po13</i>	0.2084(0.0043)	0.2084(0.0043)	0.2084(0.0043)	0.7916(0.0043)	0.0196(0.0014)	0.0294(0.0017)
	<i>Po42</i>	0.1146(0.0031)	0.1875(0.0039)	0.1146(0.0031)	0.8125(0.0039)	0.1496(0.0035)	0.1445(0.0034)
	<i>Po91</i>	0.5034(0.0048)	0.4270(0.0052)	0.3993(0.0050)	0.3854(0.0048)	0.1390(0.0034)	0.0932(0.0029)
2 loci	<i>Po1,Po13</i>	0.6817(0.0044)	0.7093(0.0043)	0.6496(0.0044)	0.2439(0.0040)	0.0403(0.0020)	0.0165(0.0012)
	<i>Po1,Po42</i>	0.7874(0.0040)	0.7735(0.0038)	0.7196(0.0045)	0.1448(0.0032)	0.0599(0.0024)	0.0090(0.0010)
	<i>Po1,Po91</i>	0.7753(0.0037)	0.7944(0.0036)	0.7753(0.0037)	0.1943(0.0036)	0.0545(0.0022)	0.0059(0.0008)
	<i>Po13,Po42</i>	0.6488(0.0052)	0.7069(0.0047)	0.6488(0.0052)	0.2870(0.0046)	0.0634(0.0024)	0.0213(0.0015)
	<i>Po13,Po91</i>	0.9576(0.0020)	0.9541(0.0021)	0.9523(0.0021)	0.0312(0.0018)	0.0419(0.0020)	0.0107(0.0011)
	<i>Po42,Po91</i>	0.8498(0.0039)	0.8464(0.0044)	0.8064(0.0047)	0.0989(0.0034)	0.0942(0.0030)	0.0480(0.0021)
3 loci	<i>Po1,Po13,Po42</i>	0.9597(0.0021)	0.9604(0.0019)	0.9391(0.0025)	0.0181(0.0014)	0.0239(0.0015)	0.0062(0.0008)
	<i>Po1,Po13,Po91</i>	0.9878(0.0011)	0.9878(0.0011)	0.9878(0.0011)	0.0104(0.0010)	0.0122(0.0011)	0.0014(0.0004)
	<i>Po1,Po42,Po91</i>	0.9483(0.0022)	0.9503(0.0022)	0.9483(0.0022)	0.0482(0.0021)	0.0132(0.0012)	0.0039(0.0006)
	<i>Po13,Po42,Po91</i>	0.9929(0.0008)	0.9920(0.0009)	0.9902(0.0010)	0.0043(0.0006)	0.0136(0.0012)	0.0044(0.0007)
4 loci	<i>Po1,Po13</i>	0.9991(0.0003)	0.9995(0.0002)	0.9991(0.0003)	0.0004(0.0002)	0.0010(0.0003)	0.0003(0.0002)
	<i>Po42,Po91</i>						0.0396(0.0020)

^{*1} Proportion of pseudo-offspring whose female or male parent, or parental couple were correctly allocated is shown. Standard deviation generated through 1,000 Monte-Carlo iterations is given in each parenthesis. Simulations were made with 1,000 iterations, and 10,000 pseudo-offspring were produced at each iteration. Parental genotypes were derived from the JASFA broodstock parents.

^{*2} A situation where both microsatellite genotypes of all candidate parents and the sex of each parent are known.

^{*3} A situation where microsatellite genotypes of all candidate parents are known but the sex of each parent is unknown.

^{*4} Proportion of offspring whose parental couple was not specified. An "Ambiguity" is a situation where 2 or more parental couples scored the highest (non-zero) likelihood (Duchesne *et al.* , 2002).

Table 3. Parental couples of the offspring determined on the basis of the microsatellite profiles, and the number of offspring in each family (family size)^{*1}

Family	(N)	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Male parents		M#1	M#1	M#6	M#2	M#2	M#2	M#2	M#2	M#2
Female parents		FM#4	FM#11	FM#11	FM#4	FM#7	FM#9	FM#10	FM#11	FM#12
Offspring samples										
OP0 ^{*2}	113	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	29(25.7)	14(12.4)	33(29.2)	22(19.5)	4(3.5)	11(9.7)
OP1 ^{*3}	216	1(0.5)	0(0.0)	0(0.0)	39(18.1)	44(20.4)	41(19.0)	68(31.4)	13(6.0)	10(4.6)
OP4 ^{*4}	407	0(0.0)	1(0.2)	1(0.2)	79(19.4)	71(17.4)	100(24.6)	105(25.9)	18(4.4)	32(7.9)
#Released	207	0	1	0	48	24	78	31	7	18
#Non-released	200	0	0	1	31	47	22	74	11	14

^{*1} Proportion of the family size in each sample is shown in parenthesis(%)
^{*2} Random sample collected within 24 h after hatching.
^{*3} Random sample collected at 1 month after hatching.
^{*4} Size-sorted sample collected at the age of 4 months (for details, see text).

three families after correction of the significance level for 18 simultaneous test (Rice, 1989) ($p<0.0028$), in family E (between OP 0 and OP 1 samples, $z=3.68$, $p=0.0002$; OP 0-OP 4, $z=3.46$, $p=0.0005$), family G (OP 0-OP 1, $z=4.13$, $p=0.0000$), and family I (OP 1-OP 4, $z=3.03$, $p=0.0024$, marginal significance). Although this study cannot evidently determine the causes of the significant fluctuations in family size, these results might be due to differences in the initial offspring survival rate. The fact that all families identified in the OP 0 sample (0 day offspring) appeared in both OP 1 (1 month) and OP 4 (4 months) samples suggests that the differences of family survival performance, if any, would not result in the demise of any particular family.

Tracking released fish using DNA markers

The microsatellite-based parental allocation revealed that 114 of the 149 recaptures did not have compatible genotypes with any parental couples retrieved from each sex of the JASFA broodstock parents, and each of the remaining 35 fish was assigned unambiguously to just a single parental couple among the JASFA broodstock parents (Table 4). As cited above, the mtDNA control region of Japanese flounder is known to have an extremely high level of nucleotide variations. This is seen in the fact that the 18 JASFA broodstock parents did not share common mtDNA haplotypes with each other, although there was no variable site in the tRNA^{Pro} gene (Fig. 1 and Appendix). A total of 49 haplotypes were detected among the 149 recaptures, of which 41 fish had mtDNA haplotypes that also appeared in the JASFA broodstock female parents (Table 4 ; two recaptured fish having the same mtDNA haplotype with one male parent are also shown). The female parents of 35 recaptures inferred from microsatellite profiles were compatible to maternal lineages traced on the basis of mtDNA identity, apart from an additional six recaptures each of whose mtDNA haplotype was identical to that of a particular JASFA female parent. These six fish were rejected from 1+

JASFA fish since none of the possible parental couples in the JASFA broodstock parents generated any microsatellite genotypes compatible with those of the six recaptures across the four loci; reamplification and re-typing of microsatellite alleles enhanced the validity of the exclusions of the six fish. Finally, the affiliation of the 35 recaptures determined based on the genetic profiles were confirmed with the ALC information.

The proportion of each family estimated for the recaptured 1+ JASFA fish (family size) is illustrated in Fig. 2. When an expected family size was assumed such as the proportion of each family in the JASFA strain from which the 1+ JASFA fish originate, which was estimated when the JASFA seedlings were released into the natural environment (see above), G -test for goodness of fit (Williams, 1976; Sokal and Rohlf, 1997) revealed that there was no significant difference between the family size distribution of the 1+ JASFA fish and the expectation ($G_{\text{adj}}=2.691$, $p=0.442$, $3df$, where four families with the expectations less than 5.0 were combined).

Discussion

Unequal contribution of broodstock parents to the next generation

In most hatchery strains, an unequal contribution of broodstock to the next generation has been known to be typical, particularly when the mesocosm spawning method is used to establish hatchery strains (Taniguchi *et al.*, 1983; Sugama *et al.*, 1988; Perez-Enriquez *et al.*, 1999; Fujii, 2001; Sekino *et al.*, 2002). Hara and Sekino (2003) investigated a cultured strain of Japanese flounder, and they found that four of the six females and four of the eight males actually contributed to establish the strain. The strain screened in this study is an extreme case, especially for the broodstock males: a single male sired more than 99% offspring. Possible factors leading to the unsuccessful reproduction of other males, such as a poor sperm

quality and gametic incompatibility, are very unlikely since the hatching success of the eggs was approximately 100%. There are no records available regarding the mating behavior in the spawning tank in which the strain was founded; a scenario can be drawn such that this male simultaneously (or alternately) mated with multiple females, and there might be reproductive interaction among males at the mating event.

The effective population size of this strain was estimated to be of 3.3 (average of the 3 samples) after correction of unequal number of females and males coupled with unequal family size, on the basis of the formula proposed by Lande and Barrowclough (1987), which assumes non-Poisson distributions of gametes for each sex. The effective size was decreased by 80% of that calculated assuming all of the potential broodstock could equally contribute to the offspring pool ($N_e=16$). The most effective hatchery option to obtain a more homogenous contribution by broodstock would be to employ the stripping method with one-to-one crossing using a large number of broodstock. The stripping method is however difficult to practically adopt in routine flounder hatchery procedures due to several constraints such as the nocturnal spawning behavior and the handling-vulnerability of this species. Therefore hatchery management should be improved so as to achieve a large effective size on the premise that flounder hatchery production will continue to rely on the use of the mesocosm spawning method. The strain screened in this study originated from the fertilized eggs produced in a single night, and thus there remains a possibility that other potential broodstock would contribute to the next generation in the other days; Hirano and Yamamoto (1992) reported that ripe females released eggs intermittently but irregularly during the spawning period that lasts for three months (individual spawning days per spawning period was estimated to be of 66-88% in the 5 females examined), although there have been limited data available to address the reproductive rhythm of

Table 4. Microsatellite genotypes and mitochondrial DNA haplotypes of 43 recaptured fish, and results of parental allocation of the recaptured fish *1

Recaptured fish (ID No.)	Microsatellite genotypes			MtDNA haplotypes*2	Parental couple*3	Recaptured fish (ID No.)	Microsatellite genotypes			MtDNA haplotypes	Parental couple
	Po1	Po13	Po42				Po1	Po13	Po42		
0178	180/184	216/224	174/196	158/176	HF7	FM#7-M#2	164/180	208/224	176/236	150/158	FM#9-M#2
0337	162/188	224/224	174/178	154/158	HF12	FM#12-M#2	164/180	208/234	174/176	158/178	FM#9-M#2
0354	180/206	208/234	174/180	158/194	HF4	FM#4-M#2	162/196	208/224	174/202	150/156	FM#9-M#2
0371	162/184	216/234	174/196	156/176	HF7	FM#7-M#2	164/180	208/234	174/202	150/156	FM#9-M#2
0414	164/180	208/234	202/236	150/156	HF9	FM#9-M#2	162/190	208/214	172/186	148/184	FM#11-M#1
0508	162/162	208/224	174/180	156/158	HF10	FM#10-M#2	162/180	208/224	174/176	156/156	FM#10-M#2
0609	162/180	224/234	178/236	156/186	HF12	FM#12-M#2	162/180	212/224	180/236	156/156	FM#10-M#2
0610	164/180	218/234	174/202	150/156	HF9	FM#9-M#2	162/180	208/234	180/236	156/186	FM#10-M#2
0751	162/180	208/234	174/180	156/158	HF10	FM#10-M#2	180/206	212/234	180/236	158/194	FM#4-M#2
0752	180/196	208/234	174/176	150/156	HF9	FM#9-M#2	162/196	218/234	174/176	150/156	FM#9-M#2
0949	162/180	212/234	180/236	156/190	HF4	FM#4-M#2	162/164	208/234	174/176	156/178	FM#9-M#2
0950	162/196	218/224	174/202	150/158	HF9	FM#9-M#2	180/190	208/224	174/186	146/158	FM#11-M#2
0952	180/196	218/224	174/176	158/178	HF9	FM#9-M#2	180/196	218/224	202/236	158/178	FM#9-M#2
0953	162/164	218/234	174/176	150/158	HF9	FM#9-M#2	180/196	208/234	174/176	150/156	FM#9-M#2
1089	162/196	218/224	202/236	156/178	HF9	FM#9-M#2	162/162	208/224	180/236	156/156	FM#10-M#2
1091	180/206	212/224	174/180	158/190	HF4	FM#4-M#2	162/162	216/234	178/236	158/158	FM#12-M#2
1092	162/180	208/224	176/236	156/156	HF10	FM#10-M#2	162/180	208/224	172/236	156/190	FM#4-M#2
No parental couple assigned*4											
0179	162/216*	214/222*	172/192	160/192*	HM5	--	162/178	216/224	172/182	150/150	HF6
0230	162/232*	214/250	200/206*	148/154	HF12	--	162/162	216/216	172/202	150/160	HM5
0750	216*/232*	232*/246*	178/192	156/192*	HF12	--	176*/190	212/224	178/186	156/184	HF11
0965	180/190	216/220	178/190	158/162	HF8	--	178/232*	216/246*	192/200*	156/192*	HF12

*1 Of the 149 recaptured fish, individuals having compatibilities of microsatellite genotypes across 4 loci and/or mitochondrial DNA haplotypes with the JASFA broodstock parents are shown.
*2 For nucleotide sequences of each haplotype, see Fig. 1 and Appendix.
*3 Parental couples determined based on the microsatellite data.
*4 Parental couples of these recaptured fish were not found in the JASFA broodstock parents according to the microsatellite data. Alleles not appeared in the JASFA broodstock parents are indicated by adding an asterisk.

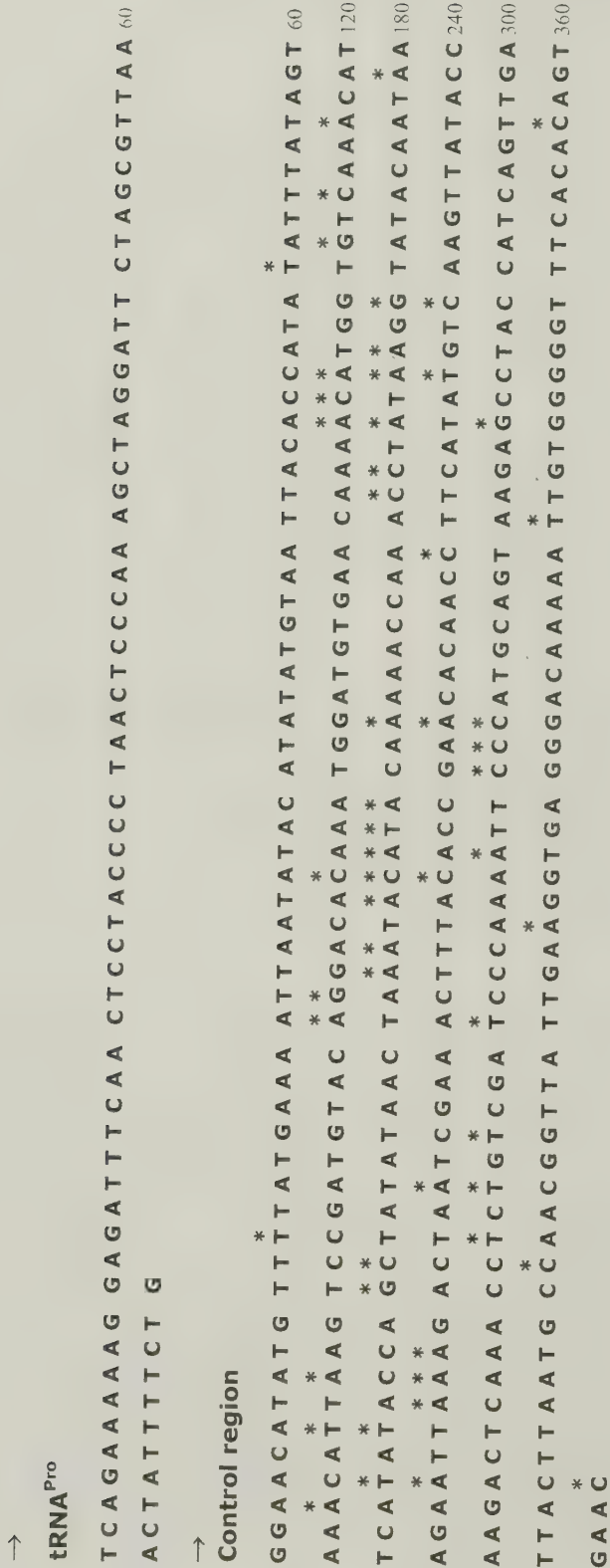


Fig. 1. A reference sequence of Japanese flounder mitochondrial DNA including the tRNA^{Pro} gene and the left domain of the control region. Location of gene refers to Saitoh *et al.* (2000). Asterisks designate variable sites detected in at least one fish of the 18 JASFA broodstock parents (see also Appendix). There was no nucleotide variation in the tRNA^{Pro} gene among 18 broodstock fish.

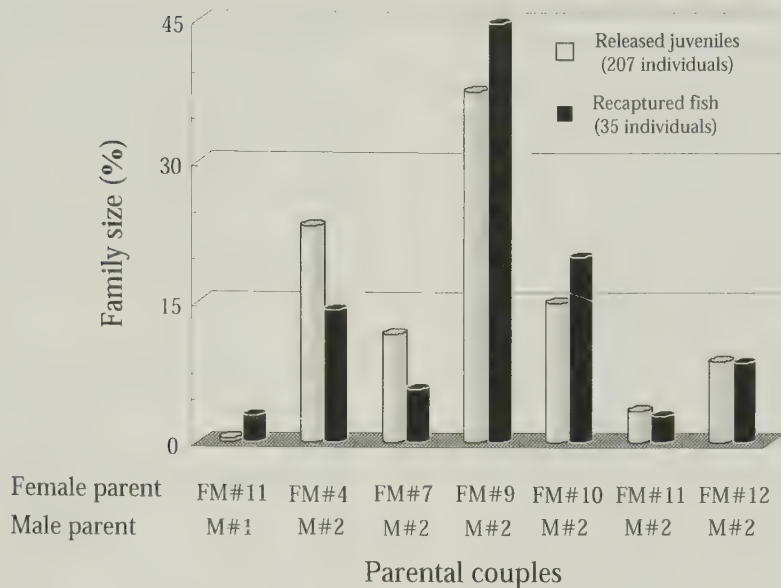


Fig. 2. Family size distribution estimated for the recaptured 1+ JASFA fish (35 individuals). Family size of flounder juveniles to be released (207 individuals) estimated when the JASFA seedlings were released into the sea, from which the recaptured 1+ JASFA fish originate, is also shown. There was no significant difference of the family size distribution between the 2 samples ($G_{adj}=2.691$, $p=0.442$).

males. In such a case, successive collection of fertilized eggs could encourage the increase of the number of actual parents. Alternatively, assuming that the skewed contribution of broodstock was largely caused by an interaction which arose among the potential broodstock such as a reproductive competition, the effective size could be increased by subdividing the broodstock into multiple spawning tanks to minimize the effects of detrimental interactions.

The feasibility of tracking released fish using DNA markers

The microsatellite profiling approach allocated 35 of the 149 recaptured fish each to a single parental couple generated from the JASFA broodstock parents. The use of four microsatellites proved to be effective to resolve parentage as the accuracy of parental allocation was evaluated in the simulation analysis. A pitfall of the microsatellite-based parental allocation is that this approach however cannot set aside a possibility that a false parental

allocation could arise by apparent genotype compatibilities, depending largely on the extent of the allelic variations and/or the relatedness structure in the population of interest; this may be of a special concern especially in its application to field studies. Another obstacle accompanied with this method refers to as transmission errors of microsatellite alleles, which may occur due most likely to typing errors of alleles, PCR errors (e.g., stuttering bands, null alleles, or larger-allele drop out), or mutations which may emerge in parental germ lines, as becoming a major issue in population genetics studies and forensic investigations (O'Connell and Wright, 1997; Marshall *et al.*, 1998; O'Reilly *et al.*, 1998; Norris *et al.*, 2000; Duchesne *et al.*, 2002), and thereby true parents would falsely be excluded, or vice versa, with a certain frequency (Marshall *et al.*, 1998). All the causes described above would prompt an unsuccessful or false parental allocation; using large a number of loci with high allelic diversity (Bernatchez and Duchesne, 2000) coupled with application of parental allocation methods

tolerable to a measure of allele transmission errors (SanCristobal and Chevalet, 1997; Marshall *et al.*, 1998; Duchesne *et al.*, 2002) will achieve a high rate of parentage assignment success. Alternatively, a simultaneous use of other classes of genetic marker, if available, could also allow a credible parental allocation through tracing paternity or maternity of given offspring. This study adopted the nucleotide sequences of mtDNA control region, from which in the case of Japanese flounder a wealth of information to track maternal lineages can be derived. The use of mtDNA haplotype identity alone might result in an overestimation of 1+ JASFA fish; nevertheless the maternal information provides much evidence to improve the reliability of the microsatellite-based parental allocation.

The hypermelanosis phenomenon that typically appears in hatchery-raised flounder enables the discrimination of released hatchery fish from wild ones without much laborious work, but again, the interest of this study lies in the affiliation of released flounder to the source hatchery under the situation that recaptured flounder are from two or more hatchery strains. With the several advantageous properties of the DNA-based parental allocation as mentioned in the introductory section, this method would be currently the most promising approach to meet the purposes on the premise that baseline genetic profiles of seedlings to be released, and ideally, of the parental generation are available. Recent advance of computer-oriented statistical assignment methods based on multilocus genotypes (multiple single locus markers; Davies *et al.*, 1999) has shed a new light on inference of the population of origin of individual fish (reviewed in Hansen *et al.*, 2001a) albeit with missing or incomplete baseline genetic data of source populations (e.g., Hansen *et al.*, 2001b, 2001c). The availability of these methods however depends largely on the extent of genetic differentiation among populations against which an individual assignment is to be tested (Cornuet *et al.*, 1999), and some of these methods assume Hardy-Weinberg equilibrium of marker loci (e.g., Paetkau *et al.*, 1995;

Rannala and Mountain, 1997): hatchery strains would not necessarily be under the required conditions, where the potential performance of such statistical assignment methods would be impoverished. The author therefore suggests at this point that genetic profiling should be incorporated as a hatchery management option to elevate the accuracy and efficiency of hatchery fish tracking.

Family size of recaptured fish

The results of the parental allocation analysis coupled with the ALC information allowed concluding that the 35 recaptures were survivors of flounder juveniles produced at the JASFA hatchery in 2001. The recaptured fish screened in this study were entrapped in a set net which effectively only fished a small part of the bay area into which the flounder juveniles were released. Hence it is not evident whether the small number of the recaptured 1+ JASFA fish is attributable to a low survival performance of the released juveniles (60,000 fish) or a low rate of recapture due to dispersal. It is however very unlikely that the released flounder juveniles would have survived without an appreciable mortality on account of the predation pressure upon released flounder juveniles (Yamashita *et al.*, 1994; Furuta, 1996, 1999; Furuta *et al.*, 1998; Saitoh *et al.*, 2003) or due possibly to behavioral deficits ascribable to the long-term captivity of hatchery-reared fish under a protected environment (Olla *et al.*, 1994; D'Anna *et al.*, 2004 and references therein). While, there is little evidence that a significant family size depression would have occurred in particular families of the released JASFA fish since the family size distribution of the recaptured 1+ JASFA fish was consistent with that of JASFA seedlings estimated when the stocking practice was made (Fig. 2). The author considers that the released flounder, which had grown by the released size designed by the hatchery, could have experienced mortality under the natural environment to greater or lesser extent. However, the consistent family sizes between the two samples indicate that such mortality upon the released flounder, if any, would not arise in favor of particular families. The small number of the

recaptures and the sampling period lasted for six months should be taken into account; this leaves room for a more extensive survey to encourage the observations in order to answer the question of family survival performance of released fish under natural environments, which has a significant impact on the effective size of released fish through fluctuations in family size (Gall, 1987). Assessment of family survival performance not only under hatchery conditions but also after the release will provide more insight into better hatchery management including release techniques with which the notion of conservation biology is compatible. The parental allocation approach based on genetic profiles will promise to be of significant use to address this topic.

Acknowledgements

This study owes much to helpful contributions of T. Yamada and M. Aritaki, Miyako Station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency. I wish to express my gratitude to Dr. T. Sugaya, Kamiura station, National Center for Stock Enhancement, Fisheries Research Agency, for providing the computer program for parentage determination.

References

- Allendorf F.W. and Ryman, N., 1987: Genetic management of hatchery stocks, in "Population Genetics and Fishery Management" (ed. by Ryman, N. and Utter, F), University of Washington Press, Seattle, pp.141-159.
- Avise J.C., Arnold J., Ball R.M., Bermingham E., Lamb T., Neigel J.E., Reeb C.A., and Saunders N.C., 1987: Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **18**, 489-522.
- Bernatchez L. and Duchesne P., 2000: Individual-based genotype analysis in studies of parentage and population assignment: how many loci, how many alleles? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **57**, 1-12.
- Blom G., Nordeide J.T., Svasand T., and Borge A., 1994: Application of two fluorescent chemicals, alizarin complexone and alizarin red S, to mark otoliths of Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Aquac. Fish. Manag.*, **25** (Suppl. 1), 229-243.
- Boudry P., Collet B., Cornette F., Hervouet V., and Bonhomme F., 2002: High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture*, **204**, 283-296.
- Cornuet J.M., Piry S., Luikart G., Estoup A., and Solignac M., 1999: New methods employing multilocus genotypes to select or exclude populations as origins of individuals. *Genetics*, **153**, 1989-2000.
- D'Anna G., Giacalone V.M., Badalamenti F., and Pipitone C., 2004: Releasing of hatchery-reared juveniles of the white seabream *Diplodus sargus* (L., 1758) in the Gulf of Castellammare artificial reef area (NW Sicily). *Aquaculture*, **233**, 251-268.
- Davies N., Villablanca F.X., and Roderick G.K., 1999: Determining the source of individuals: multilocus genotyping in nonequilibrium population genetics. *TREE*, **14**, 17-21.
- Duchesne P., Godbout M.H., and Bernatchez L., 2002: PAPA (package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Mol. Ecol. Notes*, **2**, 191-193.
- FAO, 1993: Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. *FAO Fish. Rep.*, **491**, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fujii T., 2001: Genetic variability of artificially raised Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish Genet. Breed. Sci.*, **30**, 23-26 (in Japanese).
- Fujii T. and Nishida M., 1997: High sequence variability in the mitochondrial DNA control region of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **63**, 906-910.
- Furusawa T., 1997: Key problems of sea-farming associated with its perspective, in "Biology and Stock Enhancement of

- Japanese Flounder" (ed. by Minami, T. and Tanaka, M.), Koseisya-koseikaku, Tokyo, pp. 117-130 (in Japanese).
- Furuta S., 1996: Predation on juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by diurnal piscivorous fish: field observations and laboratory experiments, in "Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources" (ed. by Watanabe, Y., Yamashita, Y., and Oozeki), A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 285-294.
- Furuta S., 1999: Seasonal changes in abundance, length distribution, feeding condition and predation vulnerability of juvenile Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and prey mysid in the Tottori coastal area. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **65**, 167-174 (in Japanese with English abstract).
- Furuta S., Watanabe T., and Yamada H., 1998: Predation by fishes on hatchery-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles released in the coastal area of Tottori Prefecture. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **64**, 1-7 (in Japanese with English abstract).
- Gall G.A.E., 1987: Inbreeding, in "Population Genetics and Fishery Management" (ed. by Ryman, N. and Utter, F.), University of Washington Press, Seattle, pp. 47-87.
- Haga Y., Takeuchi T., Murayama Y., Ohta K., and Fukunaga T., 2004: Vitamin D₃ compounds induce hypermelanosis on the blind side and vertebral deformity in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Fish. Sci.*, **70**, 59-67.
- Hansen M.M., Kenchington E., and Nielsen E.E., 2001a: Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. *Fish. Fish.*, **2**, 93-112.
- Hansen M.M., Nielsen E.E., Bekkevold D., and Mensberg K.L.D., 2001b: Admixture analysis and stocking impact assessment in brown trout (*Salmo trutta*), estimated with incomplete baseline data. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **58**, 1853-1860.
- Hansen M.M., Ruzzante D.E., Nielsen E.E., and Mensberg K.L.D., 2001c: Brown trout (*Salmo trutta*) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. *Ecol. Appl.*, **11**, 148-160.
- Hara M. and Sekino M., 2003: Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture*, **217**, 107-114.
- Herbinger C.M., Doyle R.W., Pitman E.R., Paquet D., Mesa K.A., Morris D.B., Wright J.M., and Cook D., 1995: DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture*, **137**, 245-256.
- Herbinger C.M., O'Reilly P.T., Doyle R.W., Wright J.M., and O'Flynn F., 1999: Early growth performance of Atlantic salmon full-sib families reared in single family tanks versus in mixed family tanks. *Aquaculture*, **173**, 105-116.
- Hirano R. and Yamamoto E., 1992: Spawning rhythm and egg number at the individual female spawning experiment in the hirame flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Tottori Pref. Fish. Exp. Rep.*, **33**, 18-28 (in Japanese with English abstract).
- Huvet A., Balabaud K., Bierne N., and Boudry P., 2001: Microsatellite analysis of 6-hour-old embryos reveals no preferential intraspecific fertilization between cupped oyster *Crassostrea gigas* and *Crassostrea angulata*. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 448-453.
- Iwamoto A., Okouchi H., Tsuzaki T., Fukunaga T., and Kitada S., 1998: Stocking effectiveness of flounder *Paralichthys olivaceus* in Miyako Bay evaluated by a fish market census. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **64**, 830-840 (in Japanese with English abstract).
- Lande R. and Barrowclough G.F., 1987: Effective population size, genetic variation, and their use in population management, in "Viable Populations for Conservation" (ed. by Soule, M.), Cambridge University Press, Cambridge, pp. 87-124.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., and Pemberton J.M., 1998: Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.*, **7**, 639-655.
- Musfata S., Saad S., and Rahman R.A., 2003: Species studies in sea ranching: an

- overview and economic perspectives. *Rev. Fish Biol. Fish.*, **13**, 165-175.
- Norris A.T., Bradley D.G., and Cunningham E.P., 2000: Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture*, **182**, 73-83.
- O'Connell M. and Wright J.M., 1997: Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, **7**, 331-363.
- Olla B.L., Davis M.W., and Ryer C.H., 1994: Behavioral deficits in hatchery-reared fish: potential effects on survival following release. *Aquac. Fish. Manag.*, **25** (Suppl. 1), 19-34.
- O'Reilly P.T., Herbinger C.M., and Wright J.M., 1998: Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. *Anim. Genet.*, **29**, 363-370.
- Paetkau D., Calvert W., Stirling I., and Strobeck C., 1995: Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.*, **4**, 347-354.
- Perez-Enriquez R. and Taniguchi N., 1999: Use of microsatellite as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream. *Fish. Sci.*, **65**, 374-379.
- Perez-Enriquez R., Takagi M., and Taniguchi N., 1999: Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, **173**, 413-423.
- Rannala B. and Mountain J.L., 1997: Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9197-9221.
- Rice R.W., 1989: Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Rodzen J.A., Famula T.R., and May B., 2004: Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci. *Aquaculture*, **232**, 165-182.
- Saitoh K., Hayashizaki K., Yokoyama Y., Asahida T., Toyohara H., and Yamashita Y., 2000: Complete nucleotide sequence of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) mitochondrial genome: structural properties and cue for resolving teleostean relationships. *J. Hered.*, **91**, 271-281.
- Saitoh K., Takagaki M., and Yamashita Y., 2003: Detection of Japanese flounder-specific DNA from gut contents of potential predators in the field. *Fish. Sci.*, **69**, 473-477.
- Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T., 1989: Molecular cloning, a laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1659pp.
- SanCristobal M. and Chevalet C., 1997: Error tolerant parent identification from a finite set of individuals. *Genet. Res.*, **70**, 53-62.
- Schramm H.L.Jr. and Piper R.G., 1995: Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems: American Fisheries Society Symposium 15. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland, 608pp.
- Seikai T., 1997: Mechanism of abnormal pigmentation, in "Biology and Stock Enhancement of Japanese Flounder" (ed. by Minami, T. and Tanaka, M.), Koseisyakokoseikaku, Tokyo, pp. 63-73 (in Japanese).
- Sekino M., 2004: Studies on genetic management of hatchery broodstock in relation to the stock enhancement of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Bull. Fish. Res. Agen.*, **11**, 31-91.
- Sekino M. and Hara M., 2000: Isolation and characterization of microsatellite DNA loci in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* (Pleuronectiformes, Pleuronectoidei, Paralichthyidae). *Mol. Ecol.*, **9**, 2200-2202.
- Sekino M. and Hara M., 2001a: Inheritance characteristics of microsatellite DNA loci in experimental families of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 310-315.
- Sekino M. and Hara M., 2001b: Application of microsatellite markers to population genetics studies of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 572-589.
- Sekino M., Hara M., and Taniguchi N., 2002: Loss of microsatellite and mitochondrial

- DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, **213**, 101-122.
- Sekino M., Saitoh K., Yamada T., Kumagai A., Hara M., and Yamashita Y., 2003: Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, **221**, 255-263.
- Sekino M., Saitoh K., Yamada T., Hara M., and Yamashita Y., 2005: Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers. *Aquaculture*, **244**, 49-61.
- Selvamani M.J.P., Degnan S.M., and Degnan B.M., 2001: Microsatellite genotyping of individual abalone larvae: parentage assignment in aquaculture. *Mar. Biotechnol.*, **3**, 478-485.
- Sokal R.R. and Rohlf F.J., 1997: Biometry, 3rd ed., W.H. Freeman and Company, New York, 887pp.
- Sugama K., Taniguchi N., and Umeda S., 1988: An experimental study on genetic drift in hatchery population of red sea bream. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 739-744.
- Svå sand T., Kristiansen T.S., Pederson T., Salvanes A.G.V., Engelsen R., Nøvdal. G., and Nødtvedt, M., 2000: The enhancement of cod stocks. *Fish Fish.*, **1**, 173-205.
- Taniguchi N., Sumantadinata K., and Iyama S., 1983: Genetic change in the first and second generations of hatchery stock of black sea bream. *Aquaculture*, **35**, 309-320.
- White R.J., Karr J.R., and Nehlsen W., 1995: Better roles for fish stocking in Aquatic resource management, in "Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems: American Fisheries Society Symposium 15" (ed. by Schramm, H.L.Jr. and Piper, R.G), American Fisheries Society, Bethesda, Maryland pp. 527-547.
- Williams D.A., 1976: Improved likelihood ratio tests for complete contingency tables. *Biometrika*, **63**, 33-37.
- Yamashita Y., Nagahora S., Yamada H., and Kitagawa D., 1994: Effects of release size on survival and growth of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in coastal waters off Iwate Prefecture, northeastern Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **105**, 269-276.

Appendix. Variable sites detected in the mtDNA control region of each JASFA broodstock parent*¹

Parents Haplotypes		Positions*																												
		13	51	63	66	68	81	82	87	105	106	107	112	114	117	124	126	131	132	143	144	146	147	148	149	150	153	162	163	165
	Reference	T	T	A	T	A	A	G	C	A	C	A	G	C	A	T	T	G	C	A	A	A	C	A	T	A	A	C	C	A
FM#1	HF1	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	T	G	.	.	.	.	.	.
FM#2	HF2	C	C	G	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.
FM#3	HF3	.	.	.	.	C	.	.	.	.	T	G	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.
FM#4	HF4	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FM#5	HF5	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	T	.	.	.
FM#6	HF6	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	T
FM#7	HF7	.	.	.	.	.	.	A	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.
FM#8	HF8	.	.	.	.	C	.	.	.	—	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	.	.	.
FM#9	HF9	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
FM#10	HF10	C	C	G	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	T	.	.	.
FM#11	HF11	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	T	.	.	.
FM#12	HF12	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M#1	HM1	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	.	.	.	T	.
M#2	HM2	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M#3	HM3	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.
M#4	HM4	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	T	G	.	.	.	.	T	.
M#5	HM5	.	.	.	.	.	.	A ²	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	T	G	.	.	.	.	.	.	.
M#6	HM6	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.

Parents Haplotypes		Positions																											
		167	168	170	179	184	187	188	189	195	207	213	220	227	230	253	255	257	261	268	271	272	273	285	312	325	341	357	364
	Reference	A	A	G	A	A	A	A	A	A	C	A	C	T	C	T	T	T	T	A	C	C	C	G	C	A	T	C	C
FM#1	HF1	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	C	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FM#2	HF2	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	T	G	.	T	.
FM#3	HF3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	G	.	T	.
FM#4	HF4	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	C	—	.	.	T	.	.	.	.	.	.
FM#5	HF5	.	.	.	.	.	G	G	.	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	—	.	.	.	.	T	G	.	T	.
FM#6	HF6	.	.	.	.	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	—	.	.	G	.	T	G	.	T	.
FM#7	HF7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FM#8	HF8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	—	.	.	A	.	.	G	.	T	.
FM#9	HF9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
FM#10	HF10	.	.	.	G	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	.	.	.	.	.	.	T	G	.	T	.
FM#11	HF11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.
FM#12	HF12	.	.	.	.	.	G	.	G	.	.	G	.	.	T	.	.	.	.	—	.	.	.	.	T	G	.	T	.
M#1	HM1	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	T
M#2	HM2	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	—	T	T	.	.	.	.	.	.	.
M#3	HM3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M#4	HM4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M#5	HM5	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	C	C	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M#6	HM6	G	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	C	—	.	.	T	A	.	G	.	.	.

*¹ Identity of each sequence with the reference (Fig. 1) is represented by dots, and a dash designates a single nucleotide deletion.

*² Positions of nucleotide sites correspond to the reference sequence of the control region (Fig. 1).

佐渡島真野湾に放流したヒラメ種苗の被食減耗

首藤宏幸*・梶原直人*・藤井徹生*

Predation mortality of hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* released in Mano Bay, Sado Island

Hiroyuki SUDO*, Naoto KAJIHARA*, and Tetsuo FUJII*

Abstract We estimated the impact of predation by crabs and fishes on hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* released into a flounder nursery habitat in Mano Bay, Sado Island. In 2001 and 2002, nearly 50,000 reared juvenile (ca. 6.1 cm total length) were released each year and 68% and 83%, respectively, of them were estimated to suffer mortality in the first week after release. Foregut content analysis of crabs caught in the nursery, using a PCR-based technique, revealed that the swimming crab *Charybdis japonica* is a significant predator on released flounder. This finding was supported by laboratory observations that the crabs readily preyed on live reared flounder. In addition, through microscopic observations of stomach contents of piscivorous fishes, 4 species (devil stinger, 1-age Japanese flounder, spotted flathead and bartailed flathead) were identified as predators. According to the calculations based on gut content analyses and abundances of these predators, predation by swimming crabs is estimated to account for 41% and 46% of the loss of released flounder during the first week after release in 2001 and 2002, respectively, whereas predation by 4 piscivorous fishes accounted for 19% and 21% of the loss in 2001 and 2002, respectively. Thus, we conclude that predation is the major factor of heavy mortality of released flounder shortly after release.

Key words: Japanese flounder, mortality, predation, release, swimming crab

ヒラメは栽培漁業の主要対象魚種の一つで、全国で年間2,000万尾を超える種苗が放流されている。しかし、放流直後に著しい減耗が起こることがしばしば観察されており（例えば、首藤ら、1992；古田ら、1997）、本種の放流効果を向上させる上で主要な障害の一つとなっている。この減耗の要因として、被食が重要であると考えられているが、実態はほとんど不明で、ヒラメ放流種苗の被食減耗の定量を試みた研究は古田ら（1998）以外には見当たらない。ただ、彼らの研究においても、放流後10日間の急激な個体数減少の64%は捕食では説

明できず、原因不明のまま残されている。そこで、本研究では、新潟県の佐渡島真野湾をモデル海域として実際にヒラメ種苗を放流し、放流種苗の被食減耗の定量化を試みた。

材料と方法

2001年8月14日および2002年8月7日、佐渡島真野湾の湾奥部（約2.7 km²；天然ヒラメ稚魚の育成場となっている）の水深3 mの場所に、両年とも全長6.1 cmのヒ

ラメ種苗を47,000尾放流した。放流種苗とその捕食者は、幅2mの桁網（木元ら，2001）を、湾奥部11定点および湾内沖合部8定点で500m曳網して採集した。採集した捕食者の胃内容物は、イシガニについては、PCR法でヒラメに特異的なミトコンドリア（mt）DNA断片を検出することにより、魚食性魚類については、顕微鏡観察により分析した。また、イシガニとオニオコゼを捕食者とした水槽実験を行い、捕食者によるヒラメ種苗の日間摂食尾数を把握するとともに、人工種苗と天然稚魚の食べられやすさの違いを検討した。一方、放流ヒラメ種苗の被食尾数は、胃内容物からヒラメが検出された捕食者の個体数に各捕食者一日当たりのヒラメ摂食尾数を乗じて算出した。

放流ヒラメの個体数減少パターン

湾奥部のヒラメ成育場に放流したヒラメ種苗の個体数は、放流後1週間程度は1日当たり15～20%の割合で急激に減少したものの、その後は1～4%と天然稚魚と同程度の減少率を示した。これらの減少率によると、2001年はヒラメ放流数の68%が、2002年は83%が放流後1週間で姿を消した計算となる。ただし、この放流直後の減少割合は真野湾において特に高いというわけではなく、平戸市志々伎湾（17.6%/日；首藤ら，1992）や鳥取県沿岸（34.9%/日；古田ら，1997）でも同様あるいはそれ以上の急激な個体数減少を示している。一方、成育場以外の沖合定点で放流種苗が再捕されなかった事実は、この個体数減少が、成育場内での減耗であることを強く示唆している。



Fig. 1. A swimming crab (*Charybdis japonica*; 8 cm carapace width) preying on a live reared flounder (12 cm total length) in an aquarium.

イシガニと魚食性魚類による放流ヒラメの捕食

放流ヒラメが急激な個体数減少を示す放流後1週間に、湾奥部成育場で採集されたイシガニの胃内容物をPCR法で分析した結果、分析したイシガニ個体数の13～32%の割合でヒラメが検出された。さらに、水槽実験でイシガニが生きたヒラメ種苗を容易に捕食することが確認された（Fig. 1）。従って、イシガニが放流種苗の強力な捕食者である可能性が高い。ただし、今回我々が使用したPCR法では、放流種苗と天然稚魚の識別はできない。しかし、水槽実験では、天然ヒラメ稚魚はイシガニに希にしか捕食されなかったことから、野外のイシガニから検出されたヒラメmtDNAのほとんどは放流種苗のものとみなして大きな間違いはないものと思われる（被食尾数の計算には、水槽実験における人工種苗の被食割合の値を使用）。一方、魚食性魚類については、オニオコゼ、ヒラメ1歳魚、イネゴチ、マゴチの4種が、ヒラメ放流種苗の捕食者として特定された。ただし、捕食頻度はこれら4魚種を合わせても分析個体数の5～7%にとどまり、イシガニに比較すると低かった。また、天然ヒラメ稚魚は魚食性魚類の胃内から全く検出されなかった。この野外での結果は、ヒラメ種苗は容易に捕食されるが（Fig. 2）、天然稚魚はほとんど捕食されないという水槽実験の結果と一致する。

放流ヒラメの被食尾数の試算

湾奥部成育場における放流ヒラメ種苗の放流後1週間の被食尾数を算出した。その結果、イシガニが放流



Fig. 2. A devil stinger (*Inimicus japonicus*; 17 cm total length) preying on a live reared flounder (9 cm total length) in a tank.

尾数の28%（2001年）および38%（2002年）を、魚食性魚類4種が合わせて放流尾数のそれぞれ13%および18%を捕食した計算となった。これらの値は、放流後1週間の放流ヒラメの個体数減少の40%以上をイシガニの捕食で、約20%を魚食性魚類の捕食で説明できることを意味する。従って、捕食が、ヒラメ種苗の放流直後の急激な減耗の60~70%を占める主要因であったと結論できる。

謝 辞

伊藤敏晃、海老名 秀の両氏（新潟県水産海洋研究所）には、本研究を開始するに当たり多大なご援助・ご助言を頂いた。心から感謝する。また、ヒラメの種苗生産、標識付けおよび放流にご尽力頂いた新潟県水産海洋研究所佐渡水産技術センター並びに真野町栽培漁業センターの職員の方々に深謝する。更に、野外調査にご協力頂いた本間勘太郎氏（真野漁業協同組合）並びに大槻直也氏（千葉県水産総合研究センター）、水槽実

験に際し様々な便宜を図って頂いた野口昌之氏（西海区水産研究所）に感謝する。

文 献

- 古田晋平，渡部俊明，山田英明，西田輝巳，宮永貴幸，1997：鳥取県沿岸浅海域に放流したヒラメ人工種苗の分布，成長および個体数変動．日水誌，**63**，877-885.
- 古田晋平，渡部俊明，山田英明，1998：鳥取県沿岸浅海域に放流したヒラメ人工種苗の被食．日水誌，**64**，1-7.
- 木元克則，藤田 薫，野口昌之，興石裕一，2001：水産工学研究所Ⅱ型2m幅桁網の開発とヒラメ稚魚の採集効率の推定．水工研研報，**22**，67-90.
- 首藤宏幸，後藤常夫，池本麗子，富山 実，畔田正格，1992：志々伎湾におけるヒラメ放流種苗の減耗過程．西水研研報，**70**，29-37.

三陸大野湾におけるヒラメ稚魚の最適放流量の推定

山下 洋^{*1}・栗田 豊^{*2}・山田秀秋^{*3}・高橋一生^{*2}

Estimate of optimum stocking density of hatchery-raised Japanese flounder juveniles in Ohno Bay, Northeastern Japan

Yoh YAMASHITA^{*1}, Yutaka KURITA^{*2}, Hideaki YAMADA^{*3}
and Kazutaka TAKAHASHI^{*2}

Abstract In order to estimate the surplus productivity of nursery grounds available for stocked fish, we developed a sub-population growth model for juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. Using this model, we predicted the optimum stocking density above which release of hatchery-raised juvenile flounder would restrict the growth of conspecific wild juveniles as food availability will begin to limit sub-population production. The optimum stocking density for 8.5 cm TL flounder was estimated to be zero in Ohno Bay 1990 and 17,000 individuals per 250,000 m² in 1991. This indicates there was no surplus productivity for stocking of hatchery-raised flounder juveniles in the case of Ohno Bay 1990. The most important factors to affect optimum stocking density of flounder were the abundance of mysids and wild flounder juveniles at the time of release. The difference in the optimum stocking density between 1990 and 1991 was thought to be caused by those in wild flounder density (19.8 inds/1,000 m² in 1990 and 6.8 inds/1,000 m² in 1991) and in mysids abundance (177.5 mg/m² in 1990 and 393.5 mg/m² in 1991).

Key words: flounder, stock enhancement, stocking density, carrying capacity, ecophysiology model

ヒラメは栽培漁業における基幹魚種であり、1980年には既に200万尾を超える種苗が放流されている。実効ある栽培漁業を展開するためには、効率の高い放流条件を知ることが不可欠であり、最適な放流方法を開発するために多くの魚種について放流技術開発研究が行われてきた。ヒラメについてはとくに重点的な調査研究が行われ、放流時期 (Furuta, 1996)、放流サイズ (Ohkochi *et al.*, 1999; Yamashita *et al.*, 1994; 1999)、種苗性 (Furuta, 1996; 古田, 1998) などと放流効果との関係について報告されている。また、近年

は、遺伝的な多様性 (例えば, Asahida *et al.*, 2003) にとどまらず、遺伝的家系と種苗生産過程および放流後の生き残りとの関係についても明らかにされつつある (Sekino *et al.*, 2003, 2005)。これらの技術開発により、海域によっては高い放流効果も報告されているが (例えば, 藤田ら, 1993; 岩本ら, 1998; 厚地, 増田, 2004)、漁獲回収率が1%に満たない海域も多数存在する。放流技術の中で最も研究が遅れているのが環境収容力に関する研究である。環境収容力については、天然魚の発生量、餌生物の発生量、餌生物を巡る競争者

2005年11月8日受理 (Received: November 15, 2005)

^{*1} 京都大学フィールド科学教育研究センター舞鶴水産実験所 〒625-0086 京都府舞鶴市字長浜無番地 (Maizuru Fisheries Research Station, Field Science Education and Research Center, Kyoto University, Nagahama, Maizuru, Kyoto 625-0086, Japan)

^{*2} 東北区水産研究所 〒985-0001 宮城県塩釜市新浜町3-27-5 (Tohoku National Fisheries Research Institute, Shinbama, Shiogama, Miyagi 985-0001, Japan)

^{*3} 西海区水産研究所石垣支所 〒907-0451 沖縄県石垣市字梓海大田148-446 (Seikai National Fisheries Research Institute Ishigaki Branch, Fukaiota, Ishigaki, Okinawa 907-0451, Japan)

の量、これらの変動に大きな影響を与える物理・化学環境の変動など関係する要因が複雑であり、これまでほとんど研究されていない。そのため、放流量は施設の種苗生産能力、従来の放流事業の結果をもとにした経験および政策的な目標などにより決定されてきた。しかし、過度の放流は放流魚と天然魚の置き換わりや他の生物への悪影響など、効果的な栽培漁業の推進を阻害するだけでなく、健全な生態系の維持という視点からも多くの弊害を引き起こす可能性が指摘されている(Blankenship and Leber, 1995; Munro and Bell, 1997; Blaxter, 2000)。著者らは水産総合研究センター栽培プロ研の中で、魚類の成長速度と環境要因との関係を調べるために開発されたエコフィジオロジーモデルをヒラメ稚魚の個体群生産モデルに組み込み、岩手県大野湾における1989年の調査結果を用いてパラメータを設定し、環境収容力を考慮した最適な放流量の推定手法を提案した。本研究では、モデルの汎用化を目指して、このモデル開発のフィールドとなった岩手県大野湾における1990年と1991年の調査結果への適用を試みた。なお、モデルの構造及びパラメータの設定方法等については、詳細な報告を準備中である(Yamashita *et al.*, in prep.)。

試料と方法

採集調査 岩手県大野湾において、1990年は9月7日から11月13日まで、91年は9月5日から11月6日まで、西水研型ソリネット(口径2m、高さ30cm、目合3mm)を用いて水深4m、8m、10mの水深帯を中心に、ヒラメ稚魚採集調査を実施した。また、広田式ソリネット(口径60cm、高さ40cm、目合0.76mm)により、同海域においてアミ類の採集調査を行った。両曳網調査とも、曳網開始点にブイを設置し測距儀(測器社製SD5D)による測定または、事前に測定したマーカー間を曳網することにより曳網距離を推定した。採集されたヒラメ稚魚は直ちに10%中性ホルマリンで固定し、研究室において放流魚と天然魚に分けて全長と体重を測定し、胃内容物を摘出した。胃内容物は実態顕微鏡下で可能な範囲まで分類し、分類群ごとに湿重量を測定した。アミ類については、採集数が100個体以下の場合は全数、それを越える場合には原則100個体を分類し、種ごとに個体数と湿重量を測定した。

ヒラメ稚魚個体群生産モデル ヒラメ稚魚個体群生産モデルの構造は、Yamashita *et al.* (in prep.) において詳述される。ヒラメ稚魚個体群生産モデルの核になるのは、ヒラメ稚魚の個体成長モデルである。本モ

デルは、魚類の成長と環境要因との関係を調べるために、アメリカ産ニベ類の一種red drum (*Sciaenops ocellatus*) とサンフィッシュ科のblue gill (*Lepomis macrochirus*) について開発されたエコフィジオロジーモデルのパラメータを、ヒラメ稚魚の成長に適合するように調整したものである。red drumおよびblue gillのオリジナルモデルの構造については、Neill *et al.* (2004) により詳細に説明されており、モデルはインターネット上で公開され誰でも利用できる(<ftp://neilllab2.tamu.edu>)。個体成長モデル、個体群生産モデルともに、モデリング用のソフトウェアであるSTELLAを用いて作製された。

本研究では、基本的な条件となる対象海域(大野湾500m×500m)、ヒラメ稚魚の日間死亡率(天然魚2.8%、放流魚4.6%)、競争者であるアラメガレイ(*Tarphops oligolepis*)の量(当歳魚5,450個体、1歳以上1,575個体)を1989年と同じに設定した。摂餌に関しては、稚魚はアミ類の分布量に対応してそれを摂餌するが、魚類についてはヒラメ稚魚の最大日間摂餌量に対して常に一定の割合で摂餌することとした。大きく異なる条件は、推定期間をヒラメ稚魚放流直後の最初の調査から30日間(90年は、9月7日～10月6日、91年は9月5日～10月4日)としたことである。また、天然ヒラメの初期値としては、90年は9月7日、91年は9月5日の調査における天然ヒラメ稚魚の密度と平均全長および平均体重を、アミ類分布量の初期値としては、90年は8月21日と9月7日、91年は8月27日と9月5日の水深4mと8mにおける単位面積当たり平均アミ類量(mg/m^3)を用いた。モデルの水温には、調査時に測定した水温の平均値(90年20.5°C、91年19.5°C)をインプットした。

ヒラメ稚魚個体群生産モデルでは、上記の生物・非生物環境条件を入力して、天然魚および放流魚の30日後の体重を予測することができる。ここで、放流種苗の放流時のサイズを全長8.5cm、体重4.5gと仮定した。実際には大野湾において1990年には種苗34,900尾、1991年には73,400尾が放流されている。しかし、本研究は、ある時点での天然稚魚着底密度とアミ類の分布量から最適放流量を求めることが目的であり、実際の放流量は考慮しない。稚魚個体群生産モデルでは、STELLAの感度分析機能を用いて、放流数を1,000尾単位で0尾から200,000尾まで増加させ、各放流数での天然ヒラメ稚魚の30日後の体重を予測した。栽培漁業の最も重要な基本理念は、放流種苗は余剰生産力を利用し天然同種の成長と生残に影響を与えないことである。本研究ではこの理念に従って、ヒラメ天然稚魚の成長に影響を与えない最大の放流量を最適放流量とする。

結 果

90年9月7日, 91年9月5日の調査における天然ヒラメ稚魚密度と平均体重は, それぞれ19.8 個体/1,000 m², 2.19g (全長6.1cm), 6.7個体/1,000 m², 2.52g (全長6.4cm) であった。アミ類の採集量は採集時ごとに大きく変動したが, 91年8月5日の調査を除いては *Acanthomysis mitsukurii* が卓越した (Table 1)。91年8月5日にのみ *Archaeomysis* spp. の大量出現が認められた。初期値としてモデルに用いたアミ類量は, 90年177.5 mg/m², 91年393.5 mg/m² であった。また, ヒラメ稚魚は, 両年ともに9月にはアミ類を専食したが, 10月, 11月には魚類の割合が高くなった (Fig. 1)。

上記の条件下でモデルを走らせ放流数を変化させた。90年には, 30日後のヒラメ天然稚魚の体重が放流ゼロの場合14.5gと推定されたが (Fig. 2), 水温20.5℃で予測される最大成長の場合には30日後には16.4gに達することがモデルから予測された。すなわち, 放流が全く行われない場合でも, 餌不足により最大成長には達しないことが示された。91年の30日後の予測体重は17.6gであり, これは水温19.5℃から予測される最大体重と一致した。放流数を増加させた場合に, 18,000尾から天然稚魚の成長が減少し始めたことから, 91年の最適放流数は17,000尾と判断された (Fig. 2)。また, 5%程度の天然魚の成長減少までは許容できると仮定すると, 90年のゼロ放流での予測体重 (14.5g) は, 16.4gの95%である15.6gを下回っており, やはり放流の余地はない。91年の最大成長の95%は16.7gであり, 天然稚魚の成長に対する5%の影響を許容した場合の放流可能数は26,000尾となった。

放流数をゼロとし, アミ類量を変化させて感度解析を行い, どの程度のアミ類量において放流余地 (余剰生産力) が発生するかを分析した。その結果, 90年には312mg/m², 91年では107mg/m² から余剰生産力が生まれることが予測された。

考 察

本研究におけるシミュレーションにより, 余剰生産力の範囲内でヒラメ種苗を放流するという条件で最適放流量を求めたところ, 90年には種苗を放流する余地はなく, 91年には厳密な基準では17,000尾, 天然魚の成長に対する5%までの影響を認める条件では, 26,000尾を放流できるという結果となった。Yamashita *et al.* (in prep.) によると, 本モデルによる最適放流量の推定値に最も大きな影響を与える要因は, アミ類分布量と天然稚魚密度である。90年と91年を比較する

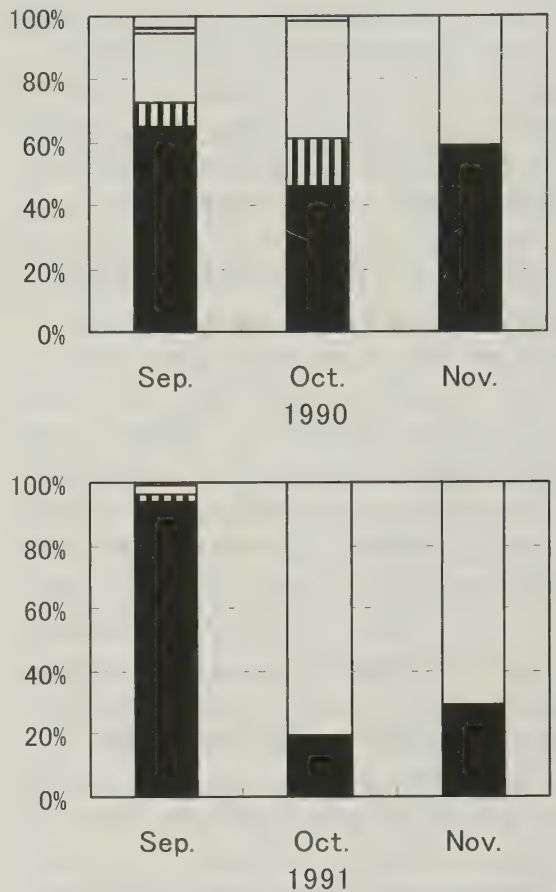


Fig. 1. Feeding habit of wild flounder juveniles. Closed bars, mysids; vertical striped bars, shrimp; open bars, fishes; horizontal striped bars, the others.

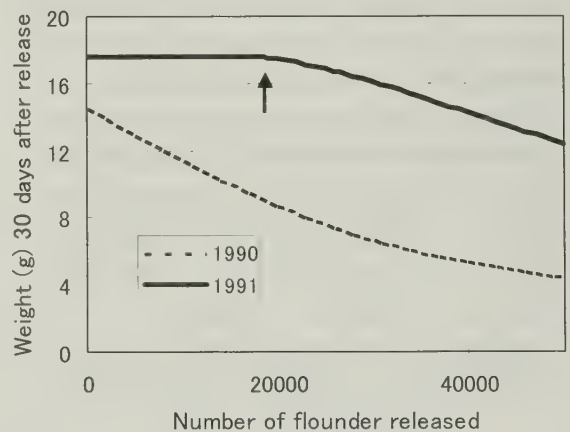


Fig. 2. The relationship between the number of flounder released and predicted growth of wild flounder juveniles 30 days after release. An arrow indicates the appropriate number of hatchery-raised juveniles for stocking (17,000 individuals) in 1991.

と、91年の方が天然稚魚密度が低くアミ類分布量が多い。91年に余剰生産力が大きかった主要な要因は、この二つと考えることができる。とくに、モデルの感度解析で放流量をゼロとしアミ類量を変化させた時に、放流余地が生まれるアミ類量は90年には312mg/m²、91年では107mg/m²であり、着底成育場に加える天然稚魚の密度が重要な要因となることがわかる。Fujii and Noguchi (1996)は、アミ類密度が100個体/m²を越えると、稚魚の成長速度が最大値に近くなることを報告しているが、この場合にも天然稚魚の着底密度は稚魚の成長速度の決定において無視できない影響要因となることが考えられる。一方、大野湾ではアミ類量も大きく変動した (Table 1)。例えば90年には、モデルに初期値として用いた9月7日まではアミ類量が低めであったが、9月11日から10月4日まで、480mg/m²から1000mg/m²という極めて高い密度で推移しており、このアミ類量をモデルに入ればかなりの放流余地があることが明確である。アミ類量の季節変動には、実際の変動とサンプリング誤差の両方が含まれている。最適放流量の予測精度を上げるためには、アミ類の分布と出現特性に対応した適切な時空間での調査を行うことにより、できるだけサンプリング誤差を減らす努力が必要である。

天然稚魚着底密度およびアミ類量以外の変動要因も多数存在する。東北太平洋沿岸域におけるヒラメの産卵期や着底期稚魚の出現期は年によってかなり異なり (栗田豊, 未発表), 同じ時期であっても稚魚の大きさには年変動が存在する。また、アミ類に対する競争者についても、本モデルではアラメガレイだけを取りあげているが、他の海域ではそのほかにも多くの種がアミ類を巡ってヒラメ稚魚と競合関係にあることが考えられ (例えば, Yamamoto and Tominaga, 2005), モデルの構造はさらに複雑にならざるを得ない。また、ヒラメ稚魚の食性は他の多くの沿岸性魚種と比較すると単純であり、着底後の初期にはアミ類を専食し徐々

に魚食性へ転換することから (例えば, 山田ら, 1998), 他の魚種と比較するとモデル化には適した種類といえる。しかし、主要な魚類餌料であるカタクチイワシやイカナゴなどは、群れで移動しヒラメの成育場に偶発的に来遊することから、魚類に対する摂餌を時系列でモデルに組み込むことは難しい。本研究では、実際の魚類摂餌割合をもとに、ヒラメ稚魚が90年は常に最大日間摂餌量の24.6%, 91年は23.6%を一律に摂餌するとして計算した。この割合は、大野湾における89年の19% (Yamashita *et al.*, in prep.) と比較的近い値になった。

本研究により、比較的生産力が高いと考えられる北日本のヒラメ成育場においても (田中ら, 2006), 年あるいは条件によっては放流種苗を支える余剰生産力がない場合のあることが示唆された。近年、ヒラメ種苗放流の事業化により、1ヵ所に10万尾を越える種苗放流も珍しくない。しかし、放流量は十分な科学的根拠を持たずに決められることが多く、環境収容力を越えた過剰放流が各地で行われている可能性が危惧される。ヒラメにとどまらず全ての栽培漁業対象種について、環境収容力に対応した放流量を決定するための手法の開発が急務である。

文 献

Asahida T., Shinotsuka Y., Yamashita Y., Saitoh K., Hayashizaki K., and Ida H., 2003:Influence of hatchery protocols on mitochondrial DNA variation in Japanese flounder juveniles. *J. World Aquacult. Soc.*, **34**, 121-132.

Blankenship H. L. and Leber K. M., 1995:A responsible approach to marine stock enhancement. *Amer. Fish. Soc. Symp.*, **15**, 167-175.

Blaxter J. H. S., 2000; The enhancement of marine fish stocks. *Adv. Mar. Biol.*, **38**, 1-54.

Table 1. Average density (mg/m²) of mysids collected at 4 m and 8m in depths at Ohno Bay.

1990				1991			
	<i>A.mitsukurii</i>	Others	Total		<i>A.mitsukurii</i>	Others	Total
Aug.21	168.4	112.9	281.3	Aug.5	0.7	1203.1	1203.8
Sep.7	48.5	25.1	73.6	Aug.27	81.1	1.9	83.0
Sep.11	433.0	47.0	480.0	Sep.5	673.1	30.9	704.0
Sep.13	468.3	30.1	498.4	Oct.15	264.8	100.6	365.4
Sep.25	581.1	123.4	704.5	Nov.6	247.4	29.9	277.3
Oct.4	846.8	199.6	1046.4				
Nov.13	177.4	74.7	252.1				

- Fujii T. and Noguchi M., 1996:Feeding and growth of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) in the nursery ground, in "Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources" (ed. by Watanabe Y., Yamashita Y. and Oozeki Y.), A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 141-151.
- 藤田恒雄, 水野拓治, 根本芳春, 1993: 福島県におけるヒラメ人工種苗の放流効果について. 栽培技研, **22**, 67-73.
- Furuta S., 1996:Predation on juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) by diurnal piscivorous fish: Field observations and laboratory experiments, in "Survival Strategies in Early Life Stages of Marine Resources" (ed. by Watanabe Y., Yamashita Y. and Oozeki Y.), A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 285-294.
- 古田晋平, 1998: ヒラメ人工種苗と天然稚魚の摂食行動の比較. 日水誌, **64**, 393-397.
- 岩本明雄, 大河内裕之, 津崎龍雄, 福永辰広, 北田修一, 1998: 魚市場の全体調査に基づく宮古湾のヒラメ種苗放流効果の推定. **64**, 830-840.
- Munro J. L. and Bell J. D., 1997:Enhancement of marine fisheries resources. *Rev. Fish. Sci.*, **5**, 185-222.
- Neill W. H., Brandes T. S., Burke B. J., Craig S. R., Dimichele L. V., Duchon K., Edwards R. E., Fontaine L. P., Gatlin D. M., Hutchins C., Miller J. M., Ponwith B. J., Stahl C. J., Tomasso J. R., and Vega R. R., 2004:Ecophys.Fish: A simulation model of fish growth in time-varying environmental regimes. *Rev. Fish. Sci.*, **12**, 233-288.
- Okouchi H., Kitada S., Tsuzaki T., Fukunaga T. and Iwamoto A., 1999:Numbers of returns and economic return rates of hatchery-released flounder *Paralichthys olivaceus* in Miyako Bay - evaluation by fish market census, in "Stock Enhancement and Sea Ranching" (ed. by Howell B. R., Moksness E. and Svåsand T.), Fishing News Books, Oxford, pp. 573-582.
- Sekino M., Saitoh K., Yamada T., Kumagai A., Hara M., and Yamashita Y., 2003:Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture*, **221**, 255-263.
- Sekino M., Saitoh K., Yamada T., Hara M. and Yamashita Y., 2005:Genetic tagging of released Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on polymorphic DNA markers. *Aquaculture*, **244**, 49-61.
- 田中庸介, 大河俊之, 山下 洋, 田中 克, 2006:ヒラメ *Paralichthys olivaceus* 稚魚の餌料環境と摂餌生態にみられる地域的多様性. 日水誌, **72**, 50-57.
- 山田秀秋, 佐藤啓一, 長洞幸夫, 熊谷厚志, 山下 洋, 1998: 東北太平洋沿岸域におけるヒラメの摂餌生態. 日水誌, **64**, 249-258.
- Yamamoto M. and Tominaga O., 2005:Feeding ecology of dominant demersal fish species, *Favonigobius gymnauchen*, *Repomucenus* spp. and *Tarphops oligolepis*, at a sandy beach in the Seto Inland Sea, Japan. *Fish. Sci.*, **71**, 1332-1340.
- Yamashita Y., Nagahora S., Yamada H., and Kitagawa D., 1994:Effects of release size on survival and growth of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* in coastal waters off Iwate Prefecture, northeastern Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **105**, 269-276.
- Yamashita Y. and Yamada H., 1999:Release strategy for Japanese flounder fry in stock enhancement programmes, in "Stock Enhancement and Sea Ranching" (ed. by Howell B. R., Moksness E. and Svåsand T.), Fishing News Books, Oxford, pp. 191-204.
- Yamashita Y., Kurita Y., Yamada H., Neill W.H. and Miller J.M. Optimum stocking density of cultured juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* for stock enhancement in Japanese waters in relation to habitat carrying capacity. in prep.

アユの種苗放流が生物の多様性に与える影響

アユサブチームリーダー
内田和男*

Stocking effectiveness and impact of ayu on river biodiversity

Kazuo UCHIDA*

乱獲や環境破壊は、アユ、マダイ、ヒラメなどの水産資源を減少させた。種苗放流の目的は、人為的に激減させた対象種を補填して漁獲量を増大すること、および再生産過程を介して資源水準を回復させることにある。アユの種苗放流は、生態系を復元する試みである一方で、生態的攪乱を助長するリスクの一部が顕在化している。これらリスクの多くは技術的に回避可能な課題であると考えられる。アユサブチームは、アユの種苗放流が生物の多様性（種、他種、生態系）に与える影響を評価する手法を確立し、負の影響を軽減するとともに天然アユの資源回復を目指した放流技術の高度化に関する研究を実施している。

アユ種苗放流の目的とリスク

近年、我が国沿岸および内水面の水産資源は低水準にあり、その原因の究明が求められている。さらに、種苗放流による積極的な資源回復への期待も大きい。漁業ではマダイやヒラメ等特定の種を選択的に漁獲する。これにより、漁獲対象種が減るだけではなく、生態ピラミッド（食物連鎖と物質循環）が変化すると考えられている。アユ種苗放流の基本的な考え方は、人為的に減少したアユ資源を補填して漁獲するとともに、変形した生態ピラミッドを復元しようとするものである。放流魚が漁獲対象となることは多くの魚種で確認されている。ところが、放流魚が生態系の中で同種や他の生物とどのように関係しながら生き残り、成長して漁獲されるのか、その後、天然集団の再生産過程にどのように組み込まれていくのかはよくわかっていない。

他方、アユの移植放流には、病原菌の拡散、人為的分布域の拡大、過剰放流による天然魚の駆逐、遺伝子汚染等、生態的攪乱のリスクを伴うことが指摘されてきた。また、1993年に日本は生物の多様性条約を批准し、水産分野では“生物の多様性を保全しつつ、水産資源を持続的に利用するための水域管理手法に関する研究”が緊急の課題となっている。なお、この条約で求められる生物の多様性保全とは、ヒトが生物を利用し続けるために必要な種内（遺伝子）、他種および生態系レベルでの多様性の保全であり、持続的漁業の概念と矛盾しない。

アユ資源と種苗放流の現状

アユは秋、河川で生まれ、冬の半年を海の沿岸域で過ごし、翌春、河川漁場に遡上・加入する。本種は夏、河川の中・上流域で石に付着した藻類を食べて成長し、秋には産卵して1年の一生を終える。このように海と川を行き来する両側回遊型アユ（天然アユ）が、日本各地の河川に分布している。

アユの漁獲量は1950年代から直線的に増加して1991年には18,000トン（約3億尾）に達した。しかし、その後減少に転じて最近では8,000トンを下回った。アユの種苗放流は、堰堤やダムで寸断された河川上流に再びアユ漁場を提供

* 中央水産研究所内水面研究部 〒386-0031 長野県上田市小牧1088 (National Research Institute of Fisheries Science, Freshwater Fisheries Division, 1088 Komaki, Ueda, Nagano 386-0031, Japan)

するなど、着実な放流効果が確認されている。河川ではすべての漁業権魚種に増殖義務が課せられ、稚アユも年間2～3億尾（1,100トン）が放流されている。放流用種苗の内訳は1999年までは琵琶湖産アユが主体であったが、最近では人工種苗の利用が増して60%を占めている。これら放流魚の多くは、移植先の天然アユとは異なる遺伝的特性を有すると考えられている。

他方、日本全体のアユを鳥瞰すると、漁獲に占める天然魚の割合は少なくとも放流魚の2～3倍以上だと推定される。この天然資源が近年、低い水準にあり、アユ漁業の衰退が懸念されている。したがって、アユの漁業・資源を回復させるためには、種苗放流においても回収だけではなく、再生産への配慮が必要と考えられる。なお、最近では放流に伴う冷水病菌の拡散が顕在化しているが、この疾病は技術的に防除可能だと考えられる。現在、アユ冷水病対策協議会（農水省、関係機関）は、河川における冷水病菌の人為的増殖を防ぐための指針を設け、その対策実行の効果を検証している。

研究の焦点

アユの種苗放流が種内に与える影響は、放流魚が競争を介して天然集団の成長に与える影響および遺伝的に異質な放流魚が再生産を介して天然集団の遺伝子に与える影響に大別される。他種や生態系への影響はアユの行動や食物網を介して現れる。これまでに、野外では放流魚（琵琶湖産アユ）が産卵に加入し、天然魚と産卵期が重複することが実証された。人工河川では放流魚と天然アユの競争、アユの環境収容力およびアユがウグイ等他種の成長に与える影響が解析され、天然アユや他種の成長に負の影響を与えないアユの密度が示された。しかし、野外では遡上から産卵までのアユ生息密度や他種との関係の実態が不明なため、実際の漁場で適正と判断される放流密度が求められなかった。

加えて、海域でのアユの生態に関する知見が乏しく、放流魚に由来する仔魚の生残過程が分かっていない。さらに、放流に伴う天然集団に対する遺伝的攪乱ならびに持続的利用の単位となるアユ個体群の構造が解明されていない。

これらの背景のなかでアユサブチームは種苗放流の生物多様性への影響評価手法を確立すること、さらに、負の影響を軽減してアユの資源水準を回復させるための放流技術を提唱することを6カ年（2001～2006年）の研究目的とした。このゴールを目指し、第1期（2001～2003年度）には以下の4つの課題を実施した。これら4つの内容の詳細は、各課題担当者によって紹介されているので、ここでは特筆される成果の概要を報告する。

第1期アユサブチーム成果の概要

（1）海域におけるアユ仔稚魚の生態特性の解明（三重大学）

三重県宮川河口周辺海域を主な調査フィールドとして、海域におけるアユ仔稚魚の分布・回遊・成長・食性などの生態特性を解析した。その結果、降海したアユ仔魚は仔魚期（体長20mm、日齢30日）まで河口周辺沿岸域に分布し、その後碎波帯に移動、体長30mm（90日齢）を過ぎると河口域へも出現し、遡上は体長50mm（160日齢）以上で始まること、および、その間の食性や生息環境の変化が明らかにされた。さらに、同水域においては、琵琶湖産アユが降海後、速やかに減耗すると推定されている。

（2）アユ仔・稚魚の海域を通じた分散過程の分子遺伝学的解析（中央水研）

日本のアユ分布域を網羅する地域個体群から標本を採集し、適正な遺伝マーカーを開発・導入して、遺伝的な個体群構造の解析が行われた。その結果、これまでに1つのグループだと見なされてきた両側回遊型個体群が、遺伝的な均一性が高いものの南日本グループと北日本グループの2つに大別された。さらに、トピックとして能登半島突端を堺として両側回遊型アユの遺伝子頻度が不連続に変化すること、琵琶湖のアユが2つのグループに大別されること、琵琶湖から流出する淀川の遡上アユから遺伝的には琵琶湖産アユに判別される個体が検出されたこと、また、鹿児島県池田湖のアユが両側回遊性個体と琵琶湖産陸封個体の交雑に起源することなど、アユ個体群がこれまでに考えられていた以上に小さな単位の集団からなることを示す多くの知見が得られた。

（3）アユの資源添加、再生産過程の定量的評価手法の開発（中央水研）

河川における放流アユの資源添加・再生産過程を定量評価する手法を開発するために、山形県鼠ヶ関川をモデル河川として漁場定着、産卵加入、および仔魚の海域への加入の各生活史段階における減耗過程を標識放流法、目視法、分布密度法等を用いて解析した。その結果、潜水目視法により河川生活期のアユ個体数の把握が可能であることが示され、2001～2003年の鼠ヶ関川では5～6月に遡上・定着したアユの11～18%が10月の産卵期まで

生き残ると推定された。さらに、2003年に試験的に放流されたアユ（最上川水系F1）が、天然魚と遜色なく資源に添加して産卵に加入することが明らかにされている。

（４）アユの種苗放流が河川生態系に与える影響の解析（中央水研）

アユのいる川といない川における魚類・水生昆虫類・藻類等の生物組成、個体密度、水質、食物連鎖関係、攻撃関係などの生物間関係が解析され、アユ、ウグイ等他魚種、藻類および昆虫が相互に強く関係し合いながら生活する姿が報告されている。さらに、水槽及び河川においてアユ種苗を大量に放流する（あるいは逆に取り除く）操作実験が行われ、アユが他魚種の成長に与える影響、逆に、他魚種がアユに与える影響が把握され、アユが生態系に与える影響のメカニズムの一端（間接的なカスケード効果）が実証された。

海域におけるアユ仔稚魚の生態特性の解明

大竹 二雄*

Early life history of ayu in coastal waters

Tsuguo OTAKE*

Abstract We examined the distribution, age, growth, and feeding of ayu larvae and juveniles in the coastal waters around the mouth of Miya River, Mie prefecture, Japan. The larvae and juveniles were also genetically distinguished between amphidromous and landlocked Lake Biwa forms to determine the possibility of recruitment of larvae originated from stocked Lake Biwa ayu. After drifting into the sea, the larvae shifted their distribution from the coastal areas near the river mouth to the surf zone as they developed into the white-bait larval stage (20mm, 30 days old). They subsequently occurred in the estuary after they reached 30–40mm (90–130 days old), and then they began their upstream migration. The earlier born and larger size juveniles tended to go upstream earlier in spring. The ayu juveniles fed mainly on copepods such as *Paracalanus* spp., *Acartia* spp., etc. which were major components of zooplankton fauna of the research area. DNA analysis of ayu larvae and juveniles clearly suggested the mortality of ayu larvae with Lake-Biwa genes just after drifting into the sea.

Key words: amphidromous ayu, land-locked ayu, migration history, growth

アユ資源は低水準にあり、卵や孵化仔魚を増やすための方策の確立が急務とされている。全国の多くの河川ではアユの増殖を目的として盛んに稚魚放流が実施されているが、天然遡上のないダム上流域などは別として、ほとんどの河川においては顕著な放流効果が見られないのが現状である。また、かつて盛んに行われ、現在も多くの河川で行われている琵琶湖産アユ（湖産アユ）稚魚の放流については、それが再生産に寄与していないことが指摘されている。その要因として湖産アユがもつ天然集団（海産アユ）とは異なる生態的・生理的特性のために海域で死滅している可能性が指摘されている。このことは湖産アユの遺伝子組成の違いに基づくものと考えられ、それが事実ならば、放流湖産アユとの交雑による海産アユの遺伝子組成の変化が、

海産アユ資源の崩壊をもたらす可能性も否定できない。

アユ資源の増加のための方策を検討するためには、まず遡上量（資源レベル）を決定する主な要因である海域における生残過程を明らかにしなければならない。すなわち海域におけるアユ仔稚魚の分布・回遊・摂餌などの初期生活史を明らかにし、アユ仔稚魚の生き残りに有利な環境を把握することが必要である。また、湖産アユの放流が海産アユ資源に与える影響を評価するためには湖産アユ由来の仔魚が真に海域で死滅しているか否かを確認し、死滅している場合にはその要因を明らかにする必要がある。

本邦におけるアユの生態に関する知見の蓄積は膨大である。しかし、それに比べて海域における仔稚魚に関する知見はあまりにも少ない（千田, 1967; 千田ら,

1967；高松，1965，1967；堀木 1988；塚本ら，1989；高橋ら，1990；Takahashi *et al.* 1998，1999；浜田，木下，1998；田子，2002a，b；東ら，2003）。そこで，本研究では伊勢湾流入河川のひとつであり，有数なアユ生産河川でもある宮川（三重県）の河口周辺海域を調査フィールドとして，アユ仔稚魚の海域における分布・回遊・摂餌などの初期生活史を明らかにすることを第一の目的とした。さらに河川流下から遡上に至るまでのアユ仔稚魚について遺伝学的手法を用いて海産アユと湖産アユの判別を行い，湖産アユ由来の仔魚の海域における死滅の可能性とその要因を探った。

調査の概要

宮川の河口内の4地点，河口を中心として東西にそれぞれ約10kmに及ぶ地域にある砂浜10地点，河口沖合い10kmまでの水域に設定した22地点（岸から2 kmまでに12地点，3 km～10kmまでに10地点を設定した）の計36地点を採集場所として，アユ仔魚の流下から遡上に至る10月から翌年6月までの期間に毎月1回調査を行った（Fig. 1）。砂浜での採集には長さ100m（袋網の目合い1.5mm）の小型地引網と長さ6 m（目合い0.33mm）の碎波帯ネット（Fig. 2）を用い，河口内や

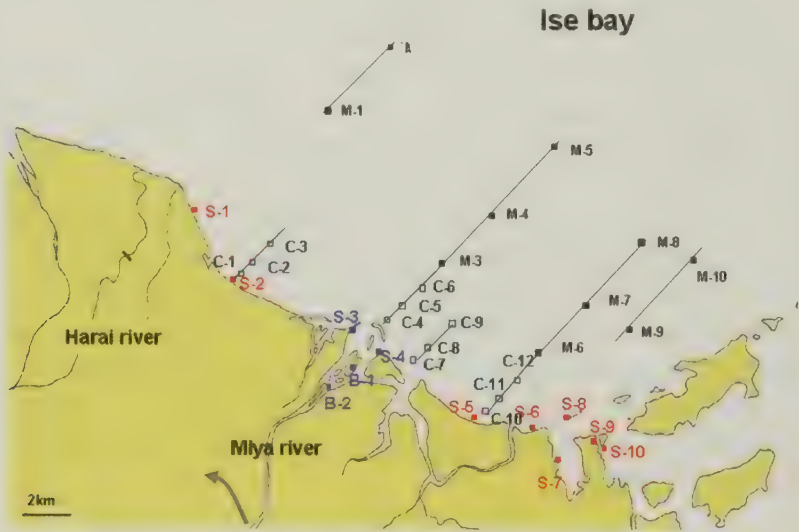


Fig. 1. Research area and sampling sites around the mouth of Miya river, Mie prefecture, Japan. Dragnet (length:100 m; mesh size at cod end:1.5 mm) and surf zone net (length: 6 m; mesh size:0.33 mm) were used for fish sampling at surf zone stations (S-1~S-10), plankton net (mouth opening: 1.2 m diameter, mesh size:0.33 mm) and sledge net (mouth opening:1.5 m x 0.4 m; mesh size:0.33 mm) were at river mouth stations (B-1~B-4) and coastal area stations (C-1~C-12 and M-1~M-10). Stations C and M were located 0.5-2 km and 3-6 km from the coastal line, respectively.



Fig. 2. Towing of surf zone net at a surf zone station (S-7). The net was towed 50 m along the coast at 1 m depth.



Fig. 3. Sledge net used for towing at bottom of coastal area

沖合い域では口径1.2mのプランクトンネットや底層を曳網するための幅1.5m、高さ0.4mのソリネット (Fig. 3) を用いた。またアユ仔稚魚の採集に併せて水温や塩分の測定、動物プランクトンの採集を行った。

採集されたアユ仔稚魚については耳石の日周輪紋や微量元素組成の解析を行い、分布・回遊過程の検討を行った。また併せて胃内容物や調査水域における動物プランクトン組成の調査を行った。

アユの耳石日周輪紋と微量元素分析

魚の内耳には耳石と呼ばれる硬組織があり、一日に一本ずつ輪紋が形成されることがよく知られている。この日周輪紋を数えることで各個体の孵化してからの日数 (日齢) や孵化日が分かるのである。近年、アユなどの通し回遊魚の耳石に微量に含まれるストロンチウム (Sr) という元素が魚の生息する場所のSr濃度に応じて変化する、すなわちSr濃度の高い海水域から濃度の低い河口域や河川淡水域へと生息場所を移行させるのに伴い耳石のSr濃度が大きく変化することが分かった (Fig. 4) (Otake & Uchida, 1996; Otake *et al.*, 2001; 新井, 2000など)。それよりアユの耳石におけるSr濃度、あるいはSr:Ca比 (カルシウムとSrの濃度比) の変化を日周輪紋と対応させて調べることで、降海したアユ仔魚がいつ頃、何日齢で河口域に來遊するようになり、さらにいつ頃、何日齢で河川を遡上したのか特定できることになる。また、日齢と体長との関係や耳石の大きさと体長との関係を求めておけば、それらの時期における各個体の体長を推定することも可能

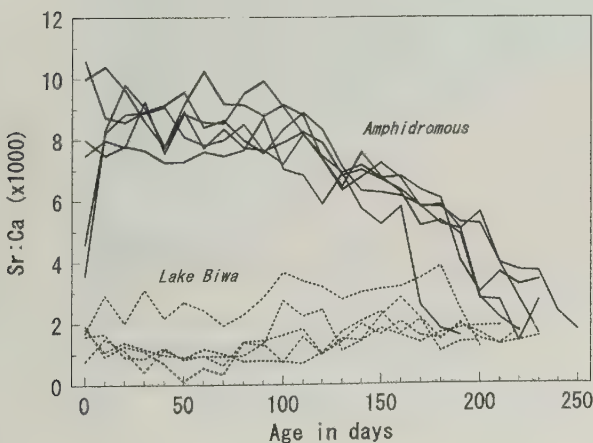


Fig. 4. Profiles of Sr:Ca ratios from the core to the edge of otolith from amphidromous and landlocked ayu.

である。本研究ではこれらの手法を用いて、アユ仔稚魚の降海から遡上に至る回遊過程を明らかにした。

アユ仔稚魚の海域における分布と遡上過程

河口から海に流出したアユ仔魚は体長約20mm (日齢30日) に成長するまで河口周辺の沿岸域に分布した (Fig. 5)。この時期の分布は河口から沖合い2~3kmに形成される潮目の内側に限られた。体長20mmまでのアユは仔魚期と呼ばれる発育段階にあり、脊椎骨、ひれ、体側筋などは十分に発達していないことから遊泳力も弱く、河川水によって運ばれた場所からは大きく移動しないものと思われる。その後、シラス稚魚 (稚アユ) へと変態するとともに河口から離れた砂浜の波打ち際へと生息場所を移し、さらに体長30mm (日齢90日) を過ぎる頃から河口域に出現するようになった (Fig. 5)。この時期にはアユの遊泳力も増し、波打ち際と河口域とを生活の場として利用しながら、岸に沿って分布域を拡大するものと思われる。そして、体長40mm (日齢130日) 頃から次第に生活の場を河口域に移し、体長50mm (日齢180日) 頃から遡上を開始した。この遡上に至るまでの生息場所の変化は河口域で採集されたアユ稚魚で調べられた耳石Sr:Ca比の変化パターンとよく一致した。

また、体長5~10mmの流下直後のアユ仔魚は表層に分布し、その後は昼夜とも底層に分布する傾向が強くなり、海に出たアユ仔魚は一度底層に移動し、底層を分布しながら次第に波打ち際に移動することが明らかになった。富山湾においてアユ仔稚魚の分布調査を行った田子 (2002) はアユ仔稚魚が塩分躍層よりも表層に分布すると報告している。本研究を行った宮川河口周辺海域は水深が10m以浅と浅く、水温や塩分も表層から底層までほとんど一定であったことから、両者の分布の違いは地形や環境の違いによるものと考えられる。なお、四万十川では河口域に留まったアユ仔魚は成長に伴い表層から底層に移動すること (高橋ら, 1990; Takahashi *et al.*, 1998), また湖産アユの仔魚は水深10~15mに分布すると報告されている (澤田ら, 1992)。また塚本ら (1989) は新宮川河口周辺域でアユ仔稚魚の分布調査を行い、採集尾数の少なかった体長9~12mmの仔魚の分布場所「未知の生息場所」が沿岸域の底層であると推定している。

アユ仔稚魚が降海してから河川を遡上するまでの回遊過程をFig. 6に模式的に示した。

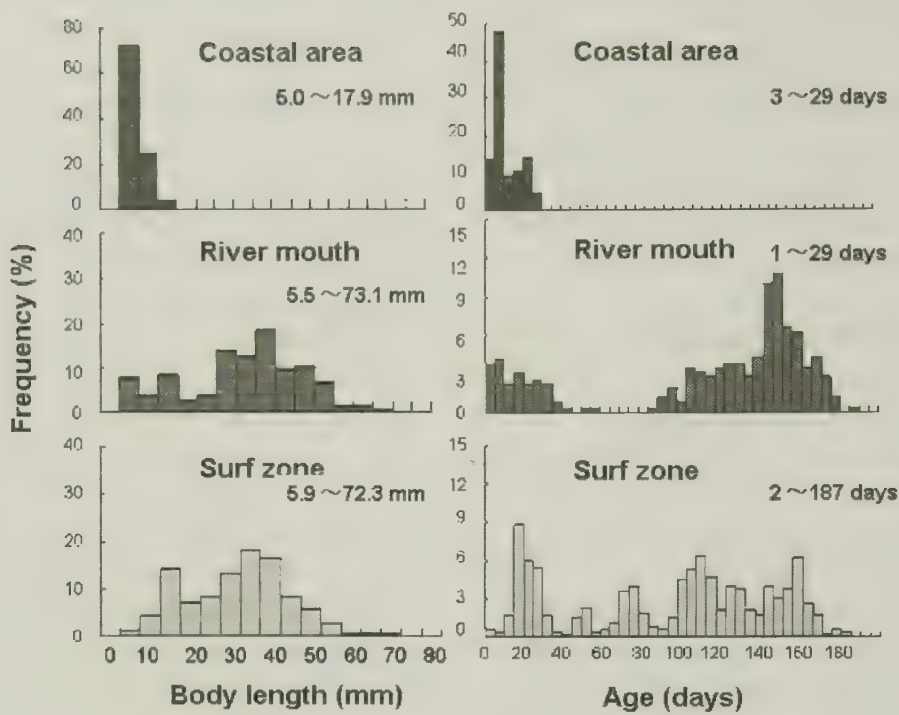


Fig. 5. Body length and daily age of ayu larvae and juveniles from coastal area (Stations C and M), river mouth (stations S-3 , 4 and stations B) and surf zone (S-1 , 2 and S-5 ~ 10). The ranges of body length and age are presented in each graph.

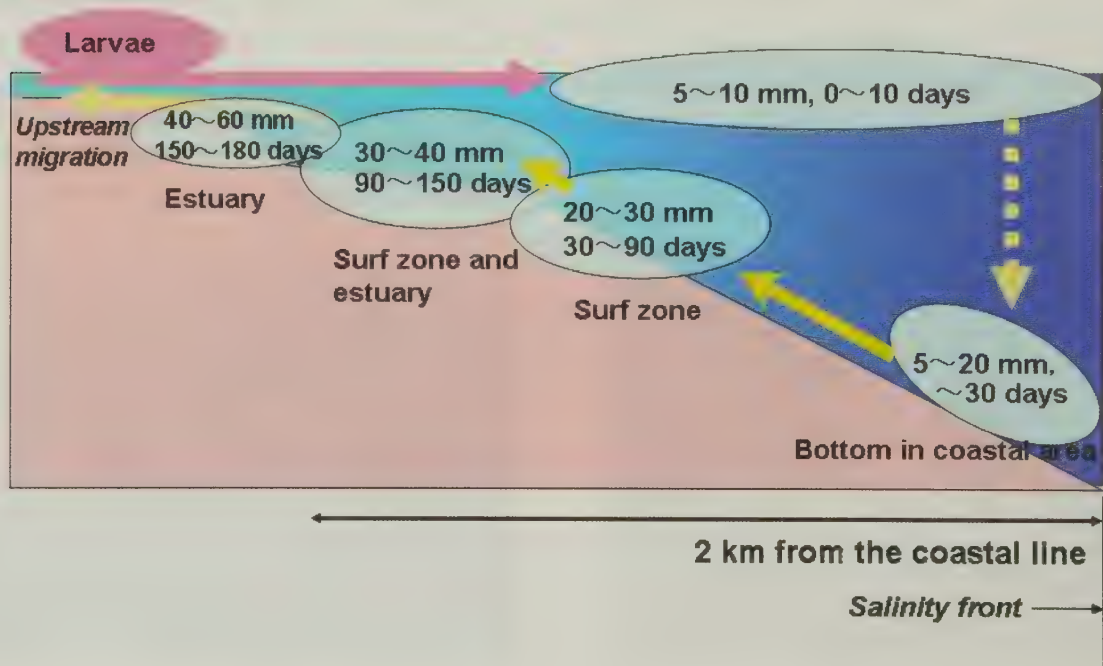


Fig. 6. Migration route of ayu in the coastal area around the mouth of Miya river

アユの遡上メカニズム

前述のように河川に遡上したアユの耳石Sr:Ca比を日周輪紋と対応させて調べることにより、各個体が河川に遡上した日齢と時期やその時の体長を推定することができる。これより遡上したアユの遡上日齢と遡上時期、遡上時の体長を推定した。これより早生まれの個体ほど遡上時期が早く、遡上時の体長や日齢が大きいことが明らかになった。一方、遅生まれ個体は成長も悪く、小型で遅い時期に遡上する傾向が強い。ただし、成長率も遡上時期に影響を及ぼし、同時期に孵化した個体でも成長率の低い個体は遅れて遡上する。早生まれ個体は総じて海水温が高い時期に発育初期を過ごすことから、その時期の成長が以後の回遊行動に影響を与えているのかもしれない。なお、遡上アユの耳石Sr:Ca比から回遊の履歴を調べてみると、早生まれの個体は早期に若齢で河口域に移動していることがわかった。塚本ら（1989）はアユの回遊の原則は、「早生まれで成長のよいものほど、若齢、小サイズで早期に移動する」ことであると述べている。早期に若齢で河口域に移動した早生まれ個体はそこで長期間過ごし、その間に大きく成長して遡上するものと考えられる。

海域におけるアユ仔稚魚の食性

河川にいたるアユが川底の石に付着する藍藻や珪藻などの付着藻類を食むことはよく知られている。それでは、遡上前の海域生活期においては何を餌にしているのだろうか？波打ち際で採集された体長20～60mmのアユ稚魚の消化管内容物を調べた。体長20～40mmのアユ稚魚はカイアシ類ノープリウス幼生やパラカラヌス属を中心としたカイアシ類を摂餌しており、体長40mm以上ではそれ以外にもアカルチア属、ハルパクテクス科などのカイアシ類、尾虫類、多毛類幼生など多様なものを摂餌するようになった。

調査した波打ち際にはオイトナ属、アカルチア属、パラカラヌス属などのカイアシ類、ウミオオメミジンコ科、尾虫類や多毛類の幼生などが多く出現した。これらの環境中のプランクトン組成とアユ稚魚の消化管内容物組成を比べるとカイアシ類を中心に環境中に多く存在するプランクトンを摂餌する傾向が強いことが伺えた。カイアシ類を主に摂餌する傾向は土佐湾の碎波帯で浜田、木下（1988）が行った調査の結果と同様である。

消化管内容物を調査したアユ稚魚の内摂餌してい

た個体の割合（摂餌率）は82.6%であった。浜田、木下（1988）によれば上佐湾の碎波帯におけるアユ稚魚の摂餌率は90.6%であり、これらの値はいずれもニンシ、マイワシ、カタクチイワシなどのシラス稚魚で報告されている摂餌率（61%、8%、23.1%）（三上ら、1961；山下、1955；魚谷、1985）に比べれば非常に高い。このことは波打ち際の餌環境が他の沿岸域に比べて良好であることを示している。実際に調査水域における環境中の生物量を波打ち際と沖合い域とで比較すると、波打ち際で高い傾向が認められた。

なお、調査したアユ稚魚1個体あたりが摂餌していた餌の数（消化管に含まれていた餌の個体数）は体長20～30mmで0.7個体、30～40mmで13.5個体、40～50mmで121.8個体、50～60mmで137.5個体であり、成長とともに顕著に増加した。

湖産アユ由来の仔魚は海域で死滅するか？

宮川におけるアユ仔魚の流下時期にあたる10月前半から12月後半にかけて採集された流下仔アユ、11月から4月に河口周辺の波打ち際で採集されたアユ稚魚、3月後半から7月に宮川の中・下流域で採集された遡上アユについて、PCR法によるアロザイム分析（Takeshima *et al.*, 未発表；水谷、2004）を行い、その結果に基づいて海産アユと湖産アユの判別を試みた。実験に用いたアユ稚魚や遡上アユはいずれも耳石日周輪紋解析から孵化日を推定し、孵化時期ごとにグルーピングした。

流下仔アユの遺伝子組成から推定した湖産アユの混合率は10月前半で高く、その後は大きく低下した。このことは放流湖産アユが海産アユに比べて早期に産卵していることを示し、堀部と大竹（2001）¹やOtake *et al.*（2002）が産卵アユの耳石Sr:Ca比から放流湖産アユを判別した結果と一致している。一般的にいわれているように湖産アユの産卵時期は河川に放流された場合においても、海産アユに比べて早いことが確認された。一方、波打ち際で採集されたアユ稚魚や遡上アユにおける湖産アユの混合率はきわめて低かった。流下仔アユに湖産アユが多く含まれた10月前半生まれのグループについてみても湖産アユの混合率は低く、湖産アユが海域で生き残って遡上している可能性は低いものと考えられた。このことは湖産アユ由来の遺伝子を持つアユ仔魚が降海直後に死滅している可能性を強く示唆するものである。

湖産アユは高水温下での塩分耐性が低いと考えられ

¹ 堀部妃代、大竹二雄、2001：宮川における海産アユと放流湖産アユの産卵生態，平成13年度第2回に本水産学会中部支部大会講演要旨集，20～21。

ている（田畑，東，1986；Iguchi and Yamaguchi 1994）。宮川において湖産アユの遺伝子をもつ仔魚が多く流下した10月前半の河口周辺海域の水温は20℃であり，この水温が湖産アユ由来の遺伝子をもつ仔魚の減耗に強く働いたのかもしれない。Takahashi *et al.* (2003) は，土佐湾において海水温が20℃を超える時期に降海したアユ仔魚の減耗が大きいことを報告している。

堀部，大竹（2001）やOtake *et al.* (2002)によれば，海産アユと湖産アユは同所的に産卵しているものと考えられる。Iguchi and Ito (1994)は両者が容易に交雑することを実験的に示しており，天然河川においても交雑が起きていることは間違いない。10月前半に流下したアユ仔魚の中には交雑個体も多数含まれると考えられることから，交雑個体も降海後に死滅している可能性は高い。

ま と め

土佐湾ではアユが孵化する10～11月の海水温が20℃以上である場合，アユ仔稚魚の減耗が大きいという（Takahashi *et al.*, 2003）。一方，那珂川においては2～3月における沿岸域の積算水温が高いことが海域におけるアユ稚魚の生き残りに有利に働き，遡上量の増加に繋がることが示唆されている（中村，糟谷，2004）。また，秋季の降水量（河川流量）がアユ仔魚の海域における初期分散に影響を与え（東ら，2003），それが遡上量を決める要因の一つになっている可能性もある。いずれにしても，秋～冬季における沿岸域の海象・気象条件が海域におけるアユ仔稚魚の生き残り，さらには遡上量に大きく関わっていることは否定できない。

本研究の結果，秋～冬季に孵化したアユ仔魚が降海後1ヵ月ほどで砂浜海岸の波打ち際に集まり，その後，半年近くを波打ち際と河口域で過ごすことが明らかになった。すなわち，波打ち際や河口域はアユにとっては遡上に至る一連の回遊過程の中の一つの通過点ではなく，重要な生息場所なのである。Otake *et al.* (2005)によれば，波打ち際や河口域における成長が遡上時期や遡上サイズを決定し，それらが河川に遡上した後の成長，さらには産卵時期や産卵時の体サイズにも影響するという。波打ち際や河口域における成長がアユの一生をほぼ決定するといってもよいであろう。

アユ仔稚魚の海域での成長はそれぞれの生息水域の環境特性の影響を強く受ける。アユ仔稚魚の成長や生き残りに有利な環境を特定するためには，異なる環境特性を有する水域に分布するアユの分布・成長・回遊過程などの初期生活史を相互に比較していくことが必

要となろう。Iguchiら（2002）は，琵琶湖のコアユに地域個体群が存在する可能性を指摘した。現在のところ，海産アユがどの程度の地理範囲を移動するか，あるいは母川回帰性を有するのか，まったく知見がない。今後は，ひとつの河川から降海したアユ仔稚魚の分散や移動の範囲を把握し，それらの回遊の全貌をダイナミックに捉えるため調査研究も重要となろう。

文 献

- 東 健作，平賀洋之，木下 泉，2003：降下仔アユの海域への分散に及ぼす降水量の影響。日水誌，**69**：352-358。
- 新井崇臣，2002：魚類の回遊履歴：解析手法の現状と課題。魚類学雑誌，**49**，1-23。
- 浜田理香，木下 泉，1988：土佐湾の碎波帯に出現するアユ仔稚魚の食性。魚類学雑誌，**35**，382-388。
- 堀木信男，1988：和歌山県沿岸域における稚アユの生態。水産増殖，**35**，229-235。
- Iguchi K., Ito F. 1994: Occurrence of cross-mating in Ayu, amphidromous x landlocked forms, and diploid x triploid, *Fisheries Sci.*, **60**, 653-655。
- Iguchi K., Ohkawa T., Nishida M., 2002: Genetic structure of land-locked ayu within the Biwa lake system. *Fisheries Sci.*, **68**, 138-143。
- 三上正一，田村真樹，八木英子，飯塚 篤，1961：ニシン，*Clupea pallasii* C. et V.，の初期生活史の研究。1．厚岸湾における仔魚の棲息域と食性について，北水研研報，**23**，1-16。
- 水谷祐輔，2004：高感度DNA指標から見た天然河川における放流琵琶湖産アユの遺伝的影響。三重大学生物資源学研究科修士論文。
- 中村智幸，糟谷浩一，2004：栃木県那珂川における両側回遊型アユの遡上日と遡上群数の予測。日水誌，**70**，288-296。
- Otake T. and Uchida K. 1996: Application of otolith microchemistry for distinguishing between amphidromous and non-amphidromous stocked ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fisheries Sci.*, **64**, 517-521。
- Otake T., Yamada C., and Uchida K., 2002: Contribution of stocked ayu (*Plecoglossus altivelis*) to reproduction in the Nagara River, Japan. *Fisheries Sci.*, **68**, 948-950。
- Otake T., Tanaka H., Hashimaru D., Mizutani Y., Masuda M., Mizoguchi Y., Ye H., Kondo Y., Takasaki Y., Sugahara H., and Yamada C.,

- 2005: Early life history of amphidromous ayu, *Plecoglossus altivelis altivelis*: the relationship between their early life history in coastal waters and their spawning. The 7th Indo-Pacific Fish Conference Abstract book. 180.
- 澤田宣雄, 中 賢治, 里井晋一, 田沢 茂, 水谷英志, 橋本桂樹, 1992: 湖産アユ稚仔魚の生態に関する研究. 滋賀県水試研報, **42**, 15-26.
- 千田哲資, 1967: 河口堰沖合海域における稚アユの生態. 木曾三川河口資源調査報告 3, 木曾三川河口資源調査団. 上田. 93-111.
- 千田哲資, 東 幹夫, 1967: 河口堰沖合海域における稚アユの生態Ⅱ. 木曾三川河口資源調査報告 4, 木曾三川河口資源調査団. 上田. 39 -54.
- 田畑和男, 東 幹夫, 1986: 海産, 湖産系および湖産アユ仔魚の海水飼育における生残特性. 兵庫水試研報, **24**, 29-34.
- 田子泰彦, 2002: 富山湾の河口域およびその隣接海域表層におけるアユ仔魚の出現・分布. 日水誌, **68**, 61 -71.
- 田子泰彦, 2002: 富山湾の砂浜域砕波帯周辺におけるアユ仔魚の出現, 体長分布と生息場所の変化. 日水誌, **68**, 144-150.
- 高橋勇夫, 木下 泉, 東 健作, 藤田貞二, 田中 克, 1990: 四万十川河口内に出現するアユ仔魚. 日水誌, **56**, 871-878.
- Takahashi I., Azuma K., Fujita S., and Kinoshita I., 1998: Spatial distribution of larval ayu *Plecoglossus altivelis* in the Shimanto estuary, Japan. *Fisheries Sci.*, **64**, 522-525.
- Takahashi I., Azuma K., Hiraga H., and Fujita S., 1999: Different mortality in larval stage of ayu *Plecoglossus altivelis* by birth dates in the Shimanto estuary and adjacent coastal waters. *Fisheries Sci.*, **65**, 206-210.
- 高松史朗, 1965: 伊勢湾における海産稚アユの生態—1964年10月～1965年5月の分布と組成. 木曾三川河口資源調査報告 2, 木曾三川河口資源調査団. 上田. 1 -49.
- 高松史朗, 1967: 伊勢湾における海産稚アユの生態—1965年11月～1966年5月の分布. 木曾三川河口資源調査報告 3, 木曾三川河口資源調査団. 上田. 81 -91.
- 塚本勝巳, 望月賢二, 大竹二雄, 山崎幸夫, 1989: 河口水域におけるアユ仔稚魚の分布・回遊・成長. 水産土木, **25**, 47-57.
- 魚谷逸朗, 1985: カタクチシラスの摂餌方法と食性. 日水誌, **51**, 1057 -1065.
- 山下秀夫, 1955: 九州西海域のマイワシの生長と食性の関係. 日水誌, **21**, 471 -475.

アユ個体群の構造解析における進展とその今日的意義

井口恵一朗^{*1}・武島弘彦^{*2}

Progress in analyzing fish population structure in ayu with today's significance

Kei'ichiro IGUCHI^{*1} and Hirohiko TAKESHIMA^{*2}

Abstract Studies on population structure of ayu (*Plecoglossus altivelis*) were reviewed to evaluate the present status of our task concerning genetic structure of the species. More detailed description has been allowed according to the technical progress in analysis. At first, phenotypic markers including morphological, ecological and behavioural characteristics were successful in distinguishing landlocked Lake Biwa form from amphidromous form. Allozyme analysis was used to describe new subspecies as *P. a. ryukyuensis*, and provided genetic basis on the divergence of landlocked Lake Biwa form. Mitochondrial DNA analysis observed metapopulation structure between insular and mainland local populations, while genetic structure within a Japan's amphidromous form was remained suggestive but unclear. Our study proved effectiveness of microsatellite DNA as a genetic marker, and successfully detected genetic structure within a Japan's amphidromous form. Application of microsatellite DNA can contribute to establish conservation unit and/or resource management unit.

Key words: amphidromy, phenotypic characteristics, allozyme analysis, mitochondrial analysis, microsatellite analysis, gene flow, metapopulation

アユは、遊漁や養殖の対象魚種として、内水面水産業界で根強い需要を堅持し続けている。一方で、付着藻類専食という特異なニッチ（生態的地位）から、河川生態系の中では重要な役割を担い、生物多様性の枠組みの中では鍵種としての位置を占めている。こうした事情を背景に、水産学を超えた広範な分野を巻き込みながら、本種を題材とした研究が、精力的に繰り広げられてきた。その甲斐あって、アユにまつわる知見は、いまや膨大な量となって蓄積されている。とりわけ、南北に長く延びる日本列島に分布の中心を持つ本種について、国内外の生息地を取り上げながら、そこに産するアユたちの類縁関係の解明に強い関心が払わ

れてきたことは、自然の成り行きと言える。実際に、生きた魚と直に接する遊漁者にとっては、各地のアユが醸し出す微妙な違いを認識している向きも多い。系統地理の領域においても、近年では分子レベルの分析手法の導入が加速され研究が深化しつつある（西田、1999）。新たに開発される新技術による手法で描かれた個体群像が、従来の手法で得られたものと同じであるとは限らない。さらに、新しい方法の活用は、ものの見方そのものに対しても従来にはない切り口を与えることがある。複数の研究結果を比較しようとするとき、ツールの適用限界が常に考慮されなければならない時代に入ったと言える。ツールの選択を誤ると、せっか

2005年11月30日受理 (Received: November 30, 2005)

^{*1} 中央水産研究所 〒386-0031 長野県上田市小牧1088 (National Research Institute of Fisheries Science, Komaki 1088, Ueda, Nagano 386-0031, Japan)

^{*2} 東京大学海洋研究所 〒164-8639 東京都中野区南台1-15-1 (Ocean Research Institute, University of Tokyo, Minamidai 1-15-1, Nakano, Tokyo 164-8639)

くの成果に、正しい評価が下されないという事態も起こりうる。

個体に備わった特徴のなかで、他者との識別に有効な形質をマーカー（標識）と呼ぶ。マーカーは、その性状に応じて、表現形質と遺伝形質に大別することができる。前者には、形態形質の他に、生態や行動に関わる形質が含まれている。しかし、ヒトが視覚に依存する生き物であるためか、形態形質を重用する傾向がこれまでは強かったというのが実情である。遺伝形質では、ミトコンドリアや核のゲノム情報が利用されるが、本稿では核ゲノムの情報に基づいて構成されるアロザイムについても遺伝形質の範疇に入れて扱うこととする。また、パソコンの普及による計算能力の向上が、煩雑な演算プロセスを要する統計量の使用を身近なものへと変えていった（根井，1990）。個々の計測値は、変数として取り込まれ、グループを代表する数量へと高次の意味付けが施される。さらに、個体の集まりを表現する時・空間的な階層性に対しても、その認識に変化が生じている。系統上は、属、種、亜種への流れが成立する。さらに下位に配置される生態上の単位には、個体群があった。しかし、メタ個体群の概念が持ち込まれるようになると、個体の集まりが、遺伝的交流の頻度を介してより動的に評価されるようになった（Hanski and Gilpin, 1997）。このように、現在では、利用可能なツールと解析対象とするべき単位の組み合わせが多岐に及ぶようになり、一見すると複雑な様相を呈している。

2001年（平成13年）から、独立行政法人水産総合研究センターを中核として、「生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発」研究がスタートし、2003年（平成15年）をもって第1期研究実施期間が終了した。遺伝的多様性の保全に配慮した放流手法の開発を目指して、中課題「放流対象魚の生態学的特性の解明」のなかに、実施課題「アユ仔・稚魚の海域を通じた分散過程の分子遺伝学的解析」（以下、プロジェクト研究）が設定された。背景には、日本産の両側回遊性のアユが単一の個体群を構成しているという従来の見解に対する反駁の意図があった。仔・稚魚期のアユは海域を通じて分散するために、母川以外の生息場所に定着する可能性がある。同様に再生産に成功した放流種苗についても、生息場所の拡大は起こりうる。放流個体群と在来個体群の交流は遺伝的な攪乱をもたらす、その影響が世代をまたがって伝播する事態も想定される。そこで、本プロジェクト研究では、地域間の遺伝的交流の推定を介して、アユ個体群内部の構造を解明することを目指している。研究内容は、全国からの標本の収集、遺伝マーカーの検索と適用、

個体群構造の解析に要約される。

私たちのプロジェクト研究には、特筆すべき点が二つある。一つは、解析に供した標本のサイズにあり、全国110を越す地域個体群から4,000をはるかに上回る検体が、解析に供された。これほどまでに規模の大きなアユのコレクションは、他に例をみない。もう一つは、高い分析感度が予測されるマイクロサテライトDNAが、マーカーとして利用されたことにある。膨大なサンプルを前に、手動では処理が間に合わず、ロボット技術の導入が不可欠であったことを付け加えておく。本稿では、アユの個体群構造の解析に関わるこれまでの研究成果を概観することにより、今回実施された研究における到達点の明確化を試みる。また、成果をもたらす意義や研究推進の過程で明るみになった新たな研究ニーズについても触れることにする。現在、プロジェクト課題は、第2期分として若干の改修を伴いながら、継続の最中にある。そのため、これまでの成果の多くは、未だ論文形式による公表には至っていない。未発表データに関しては、その性格上、詳述は不適切と判断した。未発表資料に基づいてプロジェクト成果の概略を記述する場合は、口頭（ポスター）発表時の出自を添付して、文献に準じて列挙した。

表現形質を使った解析

表現形質のなかでも形態形質はとりわけて、分類ならびに系統の分野において、中心的な役割を担ってきた。岩井（1980）の総説によると、アユは当初、*Salmo altivelis*として、サケ科の仲間として記載されていた。ところが1923年にはJordanにより、脊柱末端の脊椎骨の位置、幽門垂数、鰓条骨数などにおける差異を基に、アユ科としての独立が図られた。その後、脊椎や頭蓋の骨格系や初期発育様式を拠り所に、アユをキュウリウオ科に組み入れようとする考え方も勢いを増してきている。しかしながら、シラウオ科、キュウリウオ属、ワカサギ属、シシャモ属、カラフトシシャモ属、*Allosmerus*属、*Thaleichthys*属を巻き込んだ系統類縁関係の推定は、研究者の間で錯綜し、統一された見解には達していないのが現状である（Howes and Sanford, 1987; Wilson and Williams 1991; Begle, 1991; Johnson and Patterson, 1996）。収斂進化によって形態上の類似性がもたらされることもあり得るために、形態に準拠した解析では単一の解答を見出しにくいかもしれない。これに対して分子レベルでは収斂進化がほとんど起こらず、分岐後の時間経過に応じて違いが蓄積されるために、客観的かつ検証可能な系統仮説の構築が可能である。現在は、アユを含む一連の

近縁種群について、ミトコンドリアDNA全塩基配列を用いた系統解析が精力的に進められており、その成果に期待したい（石黒・西田，2004）。

形質の地理的な不連続性に着目して、種内に亜種が設定されることがある。日本列島に分布の中心を持つアユが、琉球列島にも生息することは古くから知られていた（Jordan and Tanaka, 1927）。Nishida (1988) は、形態分析とアロザイム分析を併用して、新亜種リュウキュウアユ *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* を記載した。縦列鱗数、側線上・下方横列鱗数および胸鰭条数が、基亜種からリュウキュウアユを区別する形質として挙げられた。また、脊椎骨数、側線上・下方横列鱗数および上顎上の櫛状歯数において、沖縄島産ならびに奄美大島産リュウキュウアユの間に変異があることを見出している。1970年代に入ると沖縄島から本亜種は姿を消してしまい（澤志，1997）、現在ではホルマリン固定標本を残すだけとなっている。残念ながら、沖縄島産リュウキュウアユに分子分析を適用する手立ては、今のところはない。アユは大陸側にも生息することが知られており、韓半島から中・越国境付近までの沿岸地方に不連続に分布する（西田，1990）。この中国産アユについて、ごく最近になって、亜種 *Plecoglossus altivelis chinensis* として記載する報告が提出された（Xiujuan *et al.*, 2005）。分類形質として、櫛状歯数と脊椎骨数が取り上げられており、分子レベルの解析は行われていない。

両側回遊性のアユに比べると、琵琶湖に陸封されて生息するアユは小型で成熟するものが多く、かつては、前者を大鮎、後者を小鮎と呼んで区別することがあった。琵琶湖産アユを多摩川に放流して、それが大きく成長することを確認した石川千代松は、琵琶湖産アユが両側回遊性のアユと同質のものであると考えた（石川，1930）。しかし、両者の関係が簡単に片付けられそうにはないことが、その後の漁業生産における経験的事実や調査研究を通して明らかになっていった（東，1977）。琵琶湖産アユと両側回遊性アユの比較から、次の形質に差異が見出された。計数形質；上顎櫛状歯列数や縦列鱗数（Nishida and Sawashi, 1987；西田，1988；Krittikar *et al.*, 2001）、計量形質；頭長や鰓耙長（駒田，1977；Azuma, 1981；西田，1988）、繁殖形質；卵数－卵サイズ、産卵期（Nishida, 1986；関ほか，1984；Iguchi and Yamaguchi, 1994；辻村，谷口，1994）、行動形質；ナワバリ形成能（関ほか，1984；澁谷ほか，1995）。これらの形質の多くは、原産地を離れても維持されることから、遺伝的な基礎を備えているものと理解される。琵琶湖産のアユの生活様式は、河川に遡上して大きく成長するオオアユ型と湖

に留まって小型のままで成熟するコアユ型に大別されることが知られている。東（1970，1973a，1973b，1973c）はその一連の研究の中で、発育様式、体形変異、成熟過程に着目して、オオアユ型とコアユ型を中心とした琵琶湖産アユ個体群に、さらに下位の構造を見出そうとした。しかし、耳石に刻まれる日周輪の解析からスイッチ説が提唱され、コアユ型からオオアユ型へ、あるいはオオアユ型からコアユ型への相互転換に基づく両者の連続性が示唆された（Tsukamoto *et al.*, 1987）。ミトコンドリアDNA調節領域の塩基配列をマーカーに用いたプロジェクト研究による成果は、オオアユ型とコアユ型を隔てる緩やかな分化を支持している（Iguchi *et al.*, 2002）。

両側回遊性のアユでは、産卵期や卵数－卵サイズなどの繁殖形質の変異様式に地理的な勾配が成立することが知られている（白石，鈴木，1962；Nishida, 1985；Iguchi, 1993）。繁殖形質の多くは、仔魚の生残を左右することから、適応の産物であると理解される（井口，2000）。進化上有利な形質が淘汰を経て固定され、なおかつ適応形質の取る値が地理的に変異するとき、種内の個体の集まりに空間的な構造が存在することが期待される。しかしながら、アユの示す繁殖形質は、緯度に沿って連続的に変化することから、地域個体群間の境界を特定することはない。プロジェクト研究では、膨大な標本を活用して、遡上魚の脊椎骨数が河川ごとに異なることを見出している（口頭発表；井口，小西，2005）。脊椎骨数が緯度あるいは水温に応じて変化するという法則に則って考えれば（Jordan, 1891）、海中生活を終えた稚魚の多くが、母川に回帰してくることを意味している。ただし、魚類の脊椎骨数の変異に対して積極的に適応的な意義を読み取ろうとする意見もあるが（MaDowall, 2003）、産卵場と初期成育場所の異なるアユの場合、適応論の適用には無理がある。そして、アユでは、脊椎骨が孵化水温によって機械的に変異することが実験的に確かめられている（Komada, 1977）。可塑的に変化するという性質を備えた形質では、個体群構造の検出の用にはなじまない。

形態形質をはじめとする表現形質を対象に異同を解析するという作業は、背後で働く遺伝子の異同あるいは差異の程度を推測していることに通じている（西田，1999）。しかしながら、実験条件下で交配させることが可能な飼育動物と異なり、野生動物では表現形質を遺伝マーカーとして用いることに実証的な裏づけを与えることは難しい。マーカーに対してより強固な遺伝的基礎を求めようとする傾向のなかで、形態形質を主体とする表現形質から分子形質を中心とする遺伝形質を重視する方向へ移行していくこと自体は自然の成り行

きであろう。ただし、個体群の構造解析における表現形質の存在意義が、既に色褪せてしまったわけではない。むしろ、有用な手法として威力を発揮する局面は、まだまだ残されていると言っておくべきかもしれない。たとえば、化石になってしまった過去の遺物から遺伝情報を読み取ることは困難であり、それらの個体群構造について調べようとすれば、形態情報に頼らざるを得ない。また、多くの場合、表現形質は適応の産物である。適応形質を司る遺伝情報を読み解いて、ツールとして利用することが叶うようになれば、個体群構造の弾力的な描写に道が開かれる。

分子形質を使った解析

個体内部で遺伝子からタンパク質、さらに形態的表現型へと続く情報の流れを考慮する限り、個体群の構造解析における分子形質の有効性は明快である。遺伝情報そのものであるDNA、あるいはDNAの直接の産物であるタンパク質がツールとして脚光を浴びるのは時代の趨勢を反映している。まずはタンパク質が、アロザイム分析と呼ばれる方法を通じて利用されるようになった。アロザイム分析はコストパフォーマンスに優れるため、多くの研究で活用され、それに呼応して知見も蓄積していった。やがてPCR法が開発されると、任意のDNA領域の増幅が可能になり、DNAそのものに遺伝標識としての使途が与えられた。DNAは核ゲノムとミトコンドリアゲノムの双方に含まれるが、ミトコンドリアゲノムを対象とした研究が先行していた。また、初期の研究では制限酵素多型分析が主流を占めた。DNAシーケンサーの普及に伴い、塩基配列分析が増加していった。アユを含めた魚類全般の個体群研究にあっても、新技術の導入がブレークスルーを促してきた（口頭発表：渡辺，2003）。アロザイム分析が必要とする大量の試料は対象動物の殺傷を前提としていたのに対し、PCR法の適用により少量の試料で事足りるDNA分析は、対象動物の存続を可能にする。これにより、リュウキュウアユのような希少生物の解析にも門戸が開かれた。

アロザイム分析では、諸酵素の電気泳動の移動度の違いに基づき、それら酵素を支配する遺伝子の差異を推定する。これにより、個体群内の遺伝的変異性や個体群間の遺伝的差異を定量的に推測することができるようになった。初期の研究では、アユ白筋中の*Mdh*等を材料に、遺伝的変異の存在することを確かめてから、放流効果試験の指標としての汎用性が検討されている（Sato and Ishida, 1977）。その後、地理的に隔たった地域から採取したサンプルにアロザイム分析を適用す

る研究が展開されていった。奄美大島産のアユと他産地のアユを比較して、前者が亜種レベルの分化を遂げていることが明らかにされ、遺伝距離に基づいて両者の分化が100万年前にさかのぼることが推定された（Nishida, 1985, 1986, 1988；関，1988）。基亜種の内部においては、琵琶湖に陸封されている個体群が特異であることが多くの研究において報告され、琵琶湖産アユ（以下、湖産アユ）が両側回遊性アユ（以下、海産アユ）個体群と交流を絶ってから10万年レベルの分化が生じていることが推定されている（Nishida and Takahashi, 1978；Nishida, 1986；谷口，関，1983；谷口ほか，1983；谷口ほか，1988；谷口，1994）。基亜種両側回遊性アユのなかでは、韓国産個体群と日本産個体群の間の交流が途絶えてから地質学的な時間が経過していること示されている（関ほか，1988）。また、屋久島ならびに対馬暖流島嶼域に生息する両側回遊性のアユの中には、特定の遺伝子座において本土産のアユにはないアリルを有する個体群があることが報告されている（澤志ほか，1993；澤志ほか，1998）。アロザイムレベルでは、本土両側回遊産アユの中に遺伝的な構造を読み取ることができないが、奄美大島および屋久島では島嶼内の河川間で地域個体群への分化が生じていることが示唆されている（澤志ほか，1993；Sawashi and Nishida, 1994）。一方で、湖産・海産間における*Gpi-1*や*Mpi*等の遺伝子頻度の違いに着目して、種苗添加後の個体群構造の変遷が検討されることがしばしばある。こうしたマーカーは、天然遡上アユの由来判定（原ほか，1996a, 1996b；布川ほか，2000）や河川に放流された湖産種苗の足取りの追跡に利用される（関，谷口，1988b；Azuma *et al.*, 1989；Seki *et al.*, 1994）。また、移植を契機としてダム湖等に定着した新規個体群の由来の推定にも利用されている（関，谷口，1988a；小西ほか，1993；高木ほか，2003）。

核DNAに比べて、はるかにコンパクトなサイズでまとまっているミトコンドリアDNAは、超遠心による分離・抽出が比較的簡便なことから、当初は分析対象として選ばれることが多かった。その後のPCR法の登場は、コンパクトであることに起因するメリットを払拭してしまった。しかし、ミトコンドリアDNAは、遺伝暗号がやや変則的、進化速度が全体として一桁ほど速い、組み換えなしに母系遺伝する、細胞当たりのコピー数が多いなどの点で、核DNAにはない特徴を持つため分子形質解析には有用である（西田ほか，1998）。初期の研究成果から、汎用性の高いプライマーの設計も容易である（たとえば，Kocher *et al.*, 1989）。そして、アユについても、ミトコンドリアDNAの特徴を活用した研究が積み重ねられていった。湖産および海産個体

群の塩基配列分析を通じて、両者に塩基置換頻度の有意に異なるサイトが複数箇所確認された (Iguchi *et al.*, 1997)。変異性が高いという理由から調節領域が対象とされたが、湖産と海産を完全に仕分ける塩基サイトは見出されなかった。各地の海産個体群に調節領域の塩基配列分析を適用したところ、国内の特定の地域個体群間で、塩基置換頻度に有意差が検出されることがあるという結果に留まった (Iguchi *et al.*, 1999)。ただし、韓国産と日本産の個体群の間では有意な遺伝的分化が検出された。ここまでは、すでにアロザイム分析で明らかにされた個体群像を再確認していたに過ぎない (井口, 2001)。島嶼個体群と本土産個体群を解析から、島嶼個体群の遺伝的多様性が動的平衡状態にあり、大陸－島モデルに準じたメタ個体群構造が成立していることが明らかにされた (Iguchi and Nisihda, 2000)。湖産アユについて、同一河川に遡上しているオオアユ型とコアユ型の間に、あるいはコアユ河川集団間に緩やかな隔離の徴候が見出されている (Iguchi *et al.*, 2002)。以上は調節領域の塩基配列に基づく解析結果であるが、Takeshima *et al.* (2005a) は、アユのミトコンドリアDNAのコード領域と調節領域の変異様式を比較し、調節領域のマーカーとしての性能を検討している。また、種苗に特異なミトコンドリアDNAハプロタイプを基にPCR-RFLP分析を用いて、放流された

種苗の追跡が試みられることがある (Pastene *et al.*, 1991; 池田ほか, 2001; 後藤ほか, 2002)。

核ゲノムは、2倍体の生物の体内では組み替えが容易に起こり、その上に遺伝子重複や偽遺伝子の存在が相まって、複雑な様相を呈する。その分、ミトコンドリアDNAと比べて情報量が莫大で、その中にはより変異性の高い領域も含まれており、マーカーとしての利用に高い潜在性能を備えていると考えられる。より高い精度の分析へと要望が強まっていくなか、核DNAを取りこんだ研究は、その数を増やしていくことが予想される。当初は、DNAフィンガープリントのマーカーとしての性能が試され、地域個体群の遺伝的変異量の推定に利用された (高木ほか, 1994; 関ほか, 1995)。続いて、核全体の遺伝情報を検索するAFLP分析が登場し、多型検出に有効なマーカーであることが検証された (Seki *et al.*, 1999; Kakehi *et al.*, 2005)。マイクロサテライトDNAについては、多型検出に有効なマーカーであることが確認されているものの (Takagi *et al.*, 1999)、大規模な個体群構造の解析に適用された例はこれまでにない。特異なアレル頻度を示す種苗の動向追跡に利用されていたに過ぎない (池田ほか, 2001; 田畑, 2005)。本プロジェクト研究の副産物として、池田湖産陸封アユが、海産と湖産のハイブリッド集団に変貌していることが示唆された (口頭発表; 井口ほか,



Fig. 1. Sampling locality.



Fig. 2. Genetic boundary inferred from allele frequency of *Pal-6*.

2004)。これまで個体群構造解析への発展を拒んでいる理由として、広範なレンジを網羅する地理的サンプル確保の困難さに加えて、大量分析に費やされる膨大なコスト等が考えられる。本プロジェクト研究では、全国の水産関係者の協力も得ながら、110を超える地域個体群からサンプルを集めることができた (Fig. 1)。また、ロボット技術の導入など、最新鋭の分析機器を使用する機会にも恵まれた。その甲斐あって、これまで遺伝的な構造が検出されることのなかった日本産の海産アユについて、地理的なパタンが浮かび上がりつつある。途中経過ながら、たとえば、Pal-6 遺伝子座におけるアリル頻度は、日本産海産アユを南北2つの地域個体群に大別することに成功している (Fig. 2)。地域個体群を隔てる境界には、仔・稚魚の輸送媒体となる海流等の変曲が関与していることが示唆されている (ポスター発表: Iguchi *et al.*, 2005)。現在、地域個体群数ならびに対象DNA領域を増やしているところであり、プロジェクト研究終了時には、さらに詳細な個体群像の獲得が期待される (口頭発表: 武島, 2003, ポスター発表: Takeshima *et al.*, 2005b)。

意義と展望

これまで平坦なものとなされてきた日本産アユの個体群像に構造を見出したわれわれの成果は、水産上でも重要な意味を持つと言える。現在のアユ産業は、種苗放流を抜きにしては成立が困難な状況にあり、より高い放流効果をねらって生息地を無視した種苗の移植が繰り返されている。一方、人工種苗については、地場産の親魚を導入することこそ可能ではあるが、継代飼育に伴って遺伝的多様性をたやすく消失してしまうという難点を抱えている (Iguchi *et al.*, 1999)。種苗放流に伴う遺伝的攪乱を軽減し、在来個体群の遺伝的多様性の保全ならびに持続的な有効利用を図るうえで、個体群の構造化に根拠を与える作業は不可欠なものとなる。

現行のマイクロサテライトDNAには、マーカーとしての高い性能が備わっていることが実証された。しかし同時に、自然選択に対して中立なマーカーのみに準拠したアプローチでは、保全あるいは資源管理の単位を地図上にプロットしていくうえで限界が存在することも認識しておかなければならない。卵数-卵サイズのような適応に関わる形質が地理的な勾配を持って変異することは先に記した通りある。適応形質に存在する地理的勾配を考慮すると、マイクロサテライトDNAが描く個体群構造では、依然として実態の反映からは隔たりがあることが伺われる。従来の分子マーカーを使っ

た分析に加えて、適応に関わる遺伝的変異が分子レベルで分析されるならば、より詳細な個体群像の描写も可能になることが予想される。保全や資源管理を実行するためにも、適応マーカーの適用はまさに理にかなったものになると言える。本プロジェクト研究との関連において、アロザイムを支配する遺伝子のマーカー化が、既に推し進められている (口頭発表: 高橋ほか, 2004; 武島ほか, 2004)。アユを取り巻く研究体制が牽引となり、この分野にはますますの発展が望まれる。

文 献

- 東 幹夫, 1970: びわ湖における陸封型アユの変異性に関する研究Ⅰ. 発育初期の分布様式と体形変異について. 日生態会誌, **20**, 63-76.
- 東 幹夫, 1970a: びわ湖における陸封型アユの変異性に関する研究Ⅱ. 集団の分化と諸変異について. 日生態会誌, **23**, 126-139.
- 東 幹夫, 1970b: びわ湖における陸封型アユの変異性に関する研究Ⅲ. 各集団における成熟過程, 産卵習性および形態的特徴について. 日生態会誌, **23**: 147-159.
- 東 幹夫, 1970c: びわ湖における陸封型アユの変異性に関する研究Ⅳ. 集団構造と変異性の特徴についての試論. 日生態会誌, **23**: 255-265.
- 東 幹夫, 1977: びわ湖のアユをめぐる種の問題. 淡水魚, **3**, 78-86.
- Azuma M., 1981: On the origin of Koayu, a land-locked form of amphidromous Ayu-fish, *Plecoglossus altivelis*. *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, **21**, 1291-1296.
- Azuma K., I. Kinoshita, S. Fujita and I. Takahashi, 1989: GPI isozyme and birth dates of larval ayu, *Plecoglossus altivelis* in the surf zone. *Jpn. J. Ichthyol.*, **35**, 493-496.
- Begle D. P., 1991: Relationships of the osmerid fishes and the use of reductive characters in phylogenetic analysis. *Syst. Zool.*, **40**, 33-53.
- 後藤 宏, 池田 実, 布川 誠, 東 健作, 谷口順彦, 2002: ミトコンドリアDNA分析による和歌山県沿岸域におけるアユ仔稚魚の遺伝的組成の比較. 水産育種, **32**, 127-134.
- Hanski I. A. and Gilpin M. E. (eds), 1997: *Metapopulation Biology*, Academic Press, San Diego.
- 原 徹, 齊藤 薫, 武藤義範, 1996a: アユ資源の増殖に関する研究Ⅰ 長良川に天然遡上するアユの

- 種類について. 岐水試研報, **41**, 1-5.
- 原 徹, 斉藤 薫, 武藤義範, 1996b: アユ資源の増殖に関する研究－II 長良川における産卵親魚の種類について. 岐水試研報, **41**, 7-11.
- Howes G. J. and C. P. J. Sanford, 1987: The phylogenetic position of the Plecoglossidae (Teleostei, Salmoniformis), with comments on the Osmeridae and Osmeroidae. *Proc. Congre. Eur. Ichtyol.*, 5th, Stockholm, pp. 33-53.
- Iguchi, K., 1993: Latitudinal variation in ayu egg size. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **59**, 2087.
- 井口恵一朗, 2000: 個体から集団レベルの適応: 「アユ, 水生動物の卵サイズ」(後藤 晃, 井口恵一朗編), 海游舎, 東京, pp. 43-64.
- 井口恵一朗, 2001: アユの地域個体群の遺伝的生物地理. 水産育種, **30**, 17-21.
- Iguchi K. and M. Yamaguchi, 1994: Adaptive significance of inter- and intrapopulational egg size variation in ayu *Plecoglossus altivelis* (Osmeridae). *Copeia*, **1994**, 184-190.
- Iguchi K. and M. Nishida, 2000: Genetic biogeography among insular populations of the amphidromous fish *Plecoglossus altivelis* assessed from mitochondrial DNA analysis. *Conserv. Genet.*, **1**, 147-156.
- 井口恵一朗, 小西 蘭, 2005: アユ脊椎骨数の地理的変異: 初期海中分散は限定的かも. 2005年度日本魚類学会年会講演要旨, pp. 42.
- Iguchi K., T. Ohkawa and M. Nishida, 2004: Genetic structure of land-locked ayu within the Biwa Lake System. *Fish. Sci.*, **68**, 138-143.
- Iguchi K., H. Takeshima and M. Nishida, 2005: Genetic boundaries among local populations of an amphidromous fish, the ayu. The 7th Indo-Pacific Fish Conference, Abstract Book, pp. 141.
- Iguchi K., Y. Tanimura and M. Nishida, 1997: Sequence divergence in the mtDNA control region of amphidromous and landlocked forms of ayu. *Fish. Sci.*, **63**: 901-905.
- 井口恵一朗, 武島弘彦, 仁部玄通, 西田 睦, 2004: 池田湖産アユの形質特性. 2004 (平成16) 年度日本水産学会大会 (日本農学大会水産部) 講演要旨集, p. 39.
- Iguchi K., Y. Tanimura, H. Takeshima and M. Nishida, 1999: Genetic variation and geographic population structure of amphidromous ayu *Plecoglossus altivelis* as examined by mitochondrial DNA sequencing. *Fish. Sci.*, **65**, 63-67.
- Iguchi K., K. Watanabe and M. Nishida, 1999: Reduced mitochondrial DNA variation in hatchery populations of ayu (*Plecoglossus altivelis*) cultured for multiple generations. *Aquaculture*, **178**, 235-243.
- 池田 実, 立原一憲, 布川 誠, 谷口順彦, 2001: マイクロサテライトDNAおよびミトコンドリアDNA DループのPCR-RFLP分析によるリュウキュウアユ導入集団の遺伝的評価. 水産育種, **31**, 33-37.
- 石川千代松, 1930: 鮎の話. 農学研究, **14**, 61-76.
- 石黒直哉, 西田 睦, 2004: サケ・マス類の系統と進化, サケ・マスの生態と進化 (前川光司編), 文一総合出版, 東京, pp. 15-41.
- 岩井 保, 1980: アユの仲間たち. 動物と自然, **10**, 18-22.
- Johnson G. D. and C. Patterson, 1996: Interrelationships of fishes, Relationships of lower euteleostean fishes (Stiassny, M. L. J., L. R. Parenti and G. D. Johnson eds.), Academic Press, London, pp. 251-332.
- Jordan M. S., 1891: Relations of temperature to vertebrae among fishes. *Proc. U. S. Natl. Mus.*, **14**, 107-120.
- Jordan D. S. and S. Tanaka, 1927: The fresh water fishes of the Riukiu Island, Japan. *Ann. Carnegie Mus.*, **17**, 259-280.
- Kakehi Y., K. Nakayama, K. Watanabe and M. Nishida, 1999: Inheritance of amplified fragment length polymorphism makers and their utility in population genetic analysis of *Plecoglossus altivelis*. *J. Fish Biol.*, **66**, 1529-1544.
- Kocher T. D., W. K. Thomas, A. Meyer, S. V. Edwards, S. Pääbo, F. X. Villablanca and A. C. Wilson: Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6916-6200.
- 駒田格知, 1977: 海産・湖産・人工孵化アユにおける椎体の成長. 魚雑, **24**, 128-134.
- Komada N., 1977: Influence of temperature on the vertebral number of the ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Copeia*, **1977**, 572-573.
- 小西浩司, 田中英樹, 吉沢和俱, 1993: 神流湖の陸封アユの由来. 群馬農業研究E水産, **9**, 45-49.
- Krittikar K., K. Hayashizaki, T. Asahina and H. Ida,

- 2001: Difference in number of comb-like tooth plates in amphidromous and landlocked populations of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.*, **67**: 752-757.
- McDowall, R. M., 2003: Variation in vertebral number in galaxiid fishes, how fishes swim and possible reason for pleomism. *Rev. Fish Biol. Fisheries*, **13**, 247-263.
- 根井正利, 1990: 分子進化遺伝学 (五条堀孝・斉藤成也訳), 培風館, 東京.
- Nishida M. 1985: Substantial genetic differentiation in ayu *Plecoglossus altivelis* of the Japan and Rykyu Islands. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1289-1274.
- Nishida M. 1986: Geographic variation in the molecular, morphological and reproductive characters of the ayu *Plecoglossus altivelis* (Plecoglossidae) in the Japan-Ryukyu Archipelago. *Jpn. J. Ichthyol.*, **33**, 232-248.
- 西田 睦, 1988: 同一河川環境化で成育した琵琶湖産および海産アユの繁殖形質ならびに形態の差異. 琉大理紀要, **46**, 69-75.
- Nishida M. 1988: A new subspecies of the ayu, *Plecoglossus altivelis*, (Plecoglossidae) from the Ryukyu Island. *Jpn. J. Ichthyol.*, **35**, 236-242.
- 西田 睦, 1990: アユの分布とリュウキュウアユ. 水産増殖, **38**, 200-203.
- 西田 睦, 1999: 自然史における分子のアプローチ, 「魚の自然史」(松浦啓一・宮 正樹編), 北海道大学図書刊行会, 札幌, pp. 99-116.
- Nishida M. and Y. Sawashi, 1987: Geographic differences in the number of longitudinal scales of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 2089.
- Nishida M. and Y. Takahashi, 1978: Enzyme variation in population of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **44**, 1059-1064.
- 西田 睦, 大川俊之, 岩田祐士, 1998: ミトコンドリアDNA分析による集団構造解析法. 水産育種, **26**, 81-100.
- 布川 誠, 池田 実, 谷口順彦, 2000: アイソザイム分析による東日本におけるアユの集団構造. 水産育種, **29**, 61-68.
- Pastene L. A., K. Numachi and K. Tsukamoto, 1991: Examination of reproductive success of transplanted stocks in an amphidromous fish, *Plecoglossus altivelis* (Temminck et Schlegel) using mitochondrial DNA and isozyme markers. *J. Fish Biol.*, **39**, 93-100.
- Sato R. and R. Ishida, 1977: Genetic variation in malate dehydrogenase and other isozymes in white muscle of ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Bull. Freshwat. Fish. Res. Lab.*, **27**, 75-84.
- 澤志泰正, 1997: 新聞記事に見るリュウキュウアユと地域住民の関わりの変化. 沖縄島嶼研究, **15**, 1-62.
- Sawashi Y. and M. Nishida, 1994: Genetic differentiation in populations of the Ryukyu-ayu *Plecoglossus altivelis ryukyuensis* on Amami-oshima Island. *Jpn. J. Ichthyol.*, **41**, 253-260.
- 澤志泰正, 東 幹夫, 藤本治彦, 西田 睦, 1998: 対馬暖流域の島嶼におけるアユの生息状況とその遺伝的特徴. 魚雑, **45**, 87-99.
- 澤志泰正, 藤本治彦, 東 幹夫, 西島信昇, 西田 睦, 1993: 琉球列島北部におけるアユの分布ならびにその遺伝的・形態的特徴. 日水誌, **59**, 191-199.
- 関 伸吾, 谷口順彦, 1988a: 天然湖および人工湖の移植陸封アユおよび人工採苗アユの由来について. 水産育種, **13**, 39-44.
- 関 伸吾, 谷口順彦, 1988b: アイソザイム遺伝標識による放流湖産アユの追跡. 日水誌, **54**, 745-749.
- 関 伸吾, 高木基裕, 谷口順彦, 1995: DNAフィンガープリントとアロザイム遺伝標識による野村ダム湖産アユの遺伝変異保有量の推定. 水産増殖, **42**, 97-102.
- 関 伸吾, 谷口順彦, 田 祥麟, 1988: 日本及び韓国の天然アユ集団間の遺伝的分化. 日水誌, **54**, 559-568.
- 関 伸吾, 谷口順彦, 村上幸二, 米田 実, 1984: 湖産アユと海産アユの成長・成熟および行動の比較. 淡水魚, **10**, 101-104.
- Seki S., N. Taniguchi, N. Murakami, A. Takamichi and I Takahashi, 1994: Seasonal changes in the mixing rate of restocked ayu-juveniles and assessment of native stock using an allozyme marker. *Fish. Sci.*, **60**, 31-35.
- Seki S., J. J. Agresti, G. A. E. Gall, N. Taniguchi and B. May, 1999: AFLP analysis of genetic diversity in three populations of ayu *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.*, **65**: 888-892.
- 澁谷竜太郎, 関 伸吾, 谷口順彦, 1995: 海系アユおよび琵琶湖系アユのなわばり行動の水溫別比較. 水産増殖, **43**, 415-421.
- 白石芳一, 鈴木則夫, 1962: アユの産卵生態に関する研究. 淡水区水産研究所報告, **12**, 83-107.

- 田畑和男, 2005: 海産アユ溯上河川における人工産アユの混合率に基づく再生産の確認. 水産育種, **34**, 117-122.
- 高木基裕, 谷口順彦, 1994: DNAフィンガープリントにおけるリュウキュウアユの遺伝変異保有量と地理的分化. 水産育種, **20**, 29-37.
- Takagi M., E. Shoji and N. Taniguchi, 1999: Microsatellite DNA polymorphism to reveal genetic divergence in ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Fish. Sci.*, **65**, 507-512.
- 高木基裕, 酒井治己, 今井千文, 鬼頭 均, 畑間俊弘, 藤村治夫, 大橋 裕, 2001: 阿武川ダム湖における海系放流アユの陸封化. 水産育種, **31**, 39-44.
- 高橋真紀子, 武島弘彦, 井口恵一朗, 西田 睦, 2004: DNAレベルからみたアロザイム多型の実態: アユGPIを例に. 2004 (平成16) 年度日本水産学会大会 (日本農学大会水産部) 講演要旨集, pp. 148.
- 武島弘彦, 2003: 両側回遊魚の分散と分化—アユを例に—. シンポジウム「日本産淡水魚類の分布域形成史の新しい理解に向けて」, 2003年度日本魚類学会年会講演要旨, pp. 105.
- 武島弘彦, 高橋真紀子, 水谷裕輔, 大竹二雄, 井口恵一朗, 西田 睦, 2004: アユGpi遺伝子の単離および構造決定: アロザイム多型のDNA 標識化に向けて. 2004年度日本魚類学会年会講演要旨, pp. 27.
- Takeshima H., K. Iguchi and M. Nishida, 2005a: Unexpected ceiling of genetic differentiation in the control region of the mitochondrial DNA between different subspecies of the ayu *Plecoglossus altivelis*. *Zool. Sci.*, **22**, 401-410.
- Takeshima H., K. Iguchi and M. Nishida, 2005b: Extensive population sampling and intensive microsatellite analysis enable to uncover stable genetic structuring of populations. The 7th Indo-Pacific Fish Conference, Abstract Book, pp. 140.
- 谷口順彦, 1994: 湖産アユと海産アユの違いについて. 養殖, **11**, 76-79.
- 谷口順彦, 関 伸吾, 1983: 湖産アユと海アユの遺伝的分化. 淡水魚, **9**, 53-57.
- 谷口順彦, 関 伸吾, 稲田善和, 1983: 両側回遊性, 陸封型および人口採苗アユ集団の遺伝的変異保有量と集団間の分化について. 日水誌, **49**, 1655-1663.
- 辻村明夫, 谷口順彦, 1995: 生殖形質に見られた湖産および海産アユ間の遺伝的差異. 日水誌, **61**, 165-169.
- Tsukamoto K., R. Isihda, K. Naka and T. Kajihara, 1987: Switching of size and migratory pattern in successive generations of landlocked ayu. *Am. Fish. Soc. Symp.*, **1**: 492-506.
- Wilson M. V. H. and R. R. G. Williams, 1991: New Paleocene genus and species of smelt (Teleostei: Osmeridae) from freshwater deposits of the Paskapoo Formation, Alberta, Canada, and comments on osmerid phylogeny. *J. Vertebr. Paleontol.*, **11**, 434-451.
- Xiujuan S., W. Yunfei and K. Bin, 2005: Morphological Comparison between Chinese and Japanese ayu and establishment of *Plecoglossus altivelis chinensis* Wu & Shan subsp. nov. *J Ocean Univ. China*, **4**, 61-66.
- 渡辺勝敏, 2003: 日本の淡水魚類—その分布, 変異, 種分化を巡って. 魚類学会シンポジウム「系統地理学: 日本産淡水魚類の分布域形成の新しい理解に向けて」, 2003年度日本魚類学会年会講演要旨, pp. 100.

鼠ヶ関川におけるアユ個体数の推定

内田和男^{*1}・清水昭男^{*1,2}・阿部信一郎^{*1}・佐藤年彦^{*3}・桂 和彦^{*3}・坂野博之^{*1}

Estimation of population number of ayu in the Nezugaseki River

Kazuo UCHIDA^{*1}, Akio SHIMIZU^{*1,2}, Shin-ichiro ABE^{*1}, Toshihiko SATO^{*3},
Kazuhiko KATSURA^{*3} and Hiroyuki SAKANO^{*1}

Abstract In 2001~2003 population numbers of ayu were estimated by direct underwater counting with a line transect method from April to December in the Nezugaseki River. Ayu migrated upstream from the sea into the river on May to June in 2001-2003. The maximum numbers of ayu in the river were estimated as 70,000, 105,00 and 27,000 individuals, respectively, and the fish survived 11-18% on October and then spawned. In 2003 a mark-recapture test revealed that the hatchery-reared ayu released in the Nezugaseki River showed similar survival and growth to wild ayu stock.

Key words: ayu, population number, line transect, stock enhancement

アユ資源は近年、総じて低水準にあり、アユ漁業に深刻な影響を与えている。アユの種苗放流は寸断された河川上流に再び漁場を提供するなど、着実な効果が確認されている。一方、放流アユが天然アユや他魚種に与える影響が懸念されはじめた。このため、放流魚の資源添加・再生産過程を把握して天然集団への影響を明らかにすることが望まれている。これまでに、放流魚が産卵に加入し、水域によっては天然魚と産卵が重複することが明らかにされている (Otake *et al.*, 2002)。また、飼育実験によりアユが同種やウグイ等他種の成長に与える影響が解析されており、その影響を軽減するための放流 (生息) 密度が試算されている。ところが、放流魚のみならず天然アユについても河川生活期の個体数変化はほとんどわかっていなかった。このため、河川では放流魚が与える影響を定量的に示すことができない。

そこで、平成13~15年度に実施された本プロジェクト研究「生態系保全型増養殖システム確立のための種苗生産・放流技術の開発 (第1期実施課題)」においては、河川におけるアユの生息個体数の変化を明らかにすることを目的に、山形県鼠ヶ関川をモデル河川として、遡上・漁場定着から産卵加入に至る間の減耗過程を標識放流法、DeLury法、目視法等を用いて解析した。その結果、潜水目視法によって河川に遡上・定着したアユの産卵までの減耗過程を把握することが可能だと判断された。本課題で取り組み始めた放流魚の資源添加・再生産過程の調査は、同プロジェクト研究の第2期実施課題 (平成16年から18年度) に引き継がれて放流アユが天然アユの成長と卵生産量に与える影響が定量的に解析されている。本稿では潜水目視法による河川生活期のアユ生息数の定量手法を紹介する。

2006年1月19日受理 (Received: January 19, 2006)

^{*1} 中央水産研究所内水面研究部 〒386-0031 長野県上田市小牧1088 (National Research Institute of Fisheries Science, Freshwater Fisheries Division, 1088 Komaki, Ueda, Nagano 386-0031, Japan)

^{*2} 現在所属: 中央水産研究所資源評価部 〒236-8648 神奈川県横浜市福浦 (Present address: National Research Institute of Fisheries Science, Fisheries Research Agency, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan)

^{*3} 山形県内水面水産試験場 〒992-0063 山形県米沢市 (Yamagata Prefectural Inland Water Fisheries Experiment Station, Yonezawa, Yamagata 992-0063, Japan)

調査河川ならびに個体数推定法

調査河川

アユの河川生活史を通した個体数変化を把握するため、アユが漁業権魚種に指定されて毎年放流が実施されていること、調査が容易な規模の河川であること、また、冬季に海域での調査が可能であることを満たすモデル河川として山形県鼠ヶ関川を選定した (Fig. 1)。鼠ヶ関川は、閉鎖的な湾 (鼠ヶ関湾、水域の面積0.25 m²) を介して日本海北部に注ぐ、流程十数km (川幅約10m) の規模が小さい2級河川である。河口から上流約4~5 kmに落差5 m程度の堰堤 (以下、第4堰堤と呼ぶ) が設置されており、その上流へはアユ、シロサケ等の魚類は移動できない。天然アユが遡上できる河口から第4堰堤までの範囲を調査区間とした。なお、河口から第4堰堤までの距離は、河川地図上では4 kmと算定されたが、河川敷の範囲内で流れが蛇行しているため流芯に沿った河川長の実測値は約5 kmであった。そこで、データの集計にあたっては実測した川の長さを用いた。調査区間内にはさらに3つの堰堤が、およそ1 km毎に設置されている。最下流の堰堤 (以下、第1堰堤) は、全面魚道が設けられ小型のアユも停滞することなく遡上できる。下流側から2つめの堰堤 (第2堰堤) は、落差1 m程の傾斜が大きいスロープに沿って水が流れる構造である。第2堰堤では通常の流量のとき流速が1.5 mを越えるため小型アユ (体長7 cm程度まで) の遡上が阻害され、5月~6月の遡上時期には堰堤直下に多くのアユが密集することがある。3つめの堰堤 (第3堰堤) は落差70 cm程度で傾斜が緩やか (約30°) なスロープが設けられており、アユは容易に遡上できる。鼠ヶ関川では堰堤がアユの分布に大きく

影響するため、各堰堤で仕切られた4つ (河口から第1堰堤まで、第1堰堤から河口まで、第2堰堤から第3堰堤まで、および、第3堰堤から第4堰堤まで) の堰堤区間に分けて個体数センサスやアユのサンプリングを実施した。

個体数推定法

この課題では、遡上・定着から産卵期のアユの生息数を把握することを目的とした。アユの生息密度は、河口からの距離、水深、瀬や淵など河床型、あるいは、河川横断面に沿って流芯部と岸よりで異なることがしばしば観察されており、ランダムに分布するものではない。さらに、遡上時期のアユは河口から順次上流部へと分布を広げる (Abe *et al.*, 2002)。アユは7月から9月は移動が小さいものの、産卵期には上流に分布していた個体が下り始める。このように、河川に生息するアユの分布は、非定常的であることを考慮すると、遡上・定着から産卵までの個体数変化を把握するためにはアユが生息する調査区間全体の個体数を計数するのが望ましい。アユの個体数推定法としては、標識放流法 (ピーターセン法) や除去法 (DeLury法) が用いられているが、堰堤による生息域の分断が懸念される鼠ヶ関川では適用が難しいと判断された。そこで、直接アユを数える潜水目視法 (ライントランセクト法) を採用することとした。なお、アユの潜水目視法については水野 (1991) が紹介している。

潜水目視による直接観察

2001~2003年4~10月に少なくとも月1回、流程5 kmを潜水目視 (幅2 mのライントランセクト法、目視面積9,600 m²) してアユの個体数および体長を計測した。

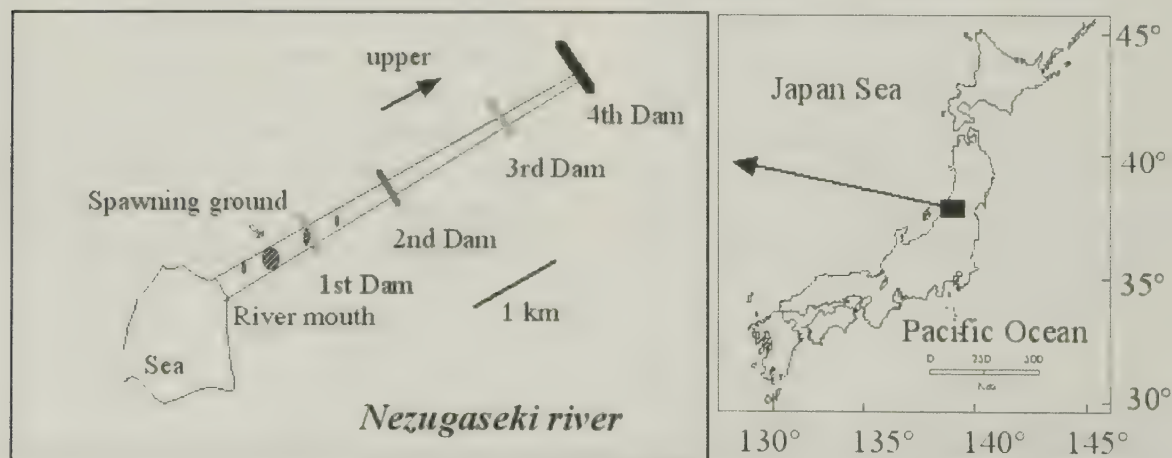


Fig. 1. Map showing the study section divided by the four dams (river mouth-1st dam, 1st-2nd dam, 2nd-3rd dam and 3rd-4th dam) in the Nezugaseki River (Yamagata Prefecture).

鼠ヶ関川のアユは、ウグイ、ヤマメ、イwana、アブラハヤ、スミウキゴリなど他魚種と形態や遊泳行動の違いにより水中でも容易に判別できる。観察は、ドライスーツ、水中めがね、シュノーケルおよび厚手の手袋を着用した観察者1～2名と、記録者1名により行った。観察者は第4堰堤を始点に上流から下流に向かって、基本的には流芯部に身体を位置させて降り、流れに対して垂直方向を目視して幅2mの視野内に出現したアユの個体数を計数した。河川の蛇行点など多くの地点で、流芯部は川断面の中心に位置せず、左岸側と右岸側では水深（流速・流量）が異なることが多い。アユは、河川断面に水深の違いに応じて分布密度や体長組成が異なる。河川断面の左岸側と右岸側の分布等の偏りを排除するために、流芯を流れる観察者は左右交互に観察した。また、この観察中、適時水面に顔を出して観察者自身の位置や幅2mの距離感を補正した。流速が高すぎて流芯部に体を保持できない早瀬などでは、頭部を上流に向けて大きめの石に掴まる、あるいは、流速の低い岸寄りに移動して、センサスする範囲のアユ個体数を正確に計数できるよう配慮した。

アユの個体数は、瀬や淵等河床型にあわせた小区間（10～88m、平均34m）毎に記録した。記録者は、予めこの小区間の特徴（河床型、川幅、流長、水深、構造物、目印など）を記載した模式河川地図を携帯し、また、岸の草木や杭につけた目印（ピンク蛍光色工事用テープ等）を参考にして地図上の位置を確認して4月から10月の各調査において、同一の小区間についての報告を観察者から受けて記録するよう配慮した。河川では豪雨・増水により流芯の位置、土石の大きさ、流長あるいは河床型が変化するので各月の観察ごとに記録者が携帯する模式河川地図は、距離や河床型などの記載に微調整を加えて更新されている。

小区間（長さ平均33m）毎に発見したアユの数を目視した面積（幅2m×小区間の長さ）で除して、その区間の生息密度（個体数/m²）を算出した。さらに、この小区間に生息するアユの数は、アユの密度に小区間の（目視しなかった部分を含めた）全面積（川幅×長さ）を乗じて算出した。

目視観察の精度を確かめるために、2002年の6月と7月に観察者2人で同一の場所を観察して、小区間毎に発見したアユの個体数を比較した。両者の目視個体数は、6月と7月の観察において、それぞれ、傾き1.01または0.98の直線に回帰された（Fig. 2）。小区間内で発見したアユ個体数の平均値は、6月は観察者Aが120（n=45）および観察者Bが127（n=45）であった。また、7月はそれぞれ、45（n=39）および45（n=39）であった。これらの結果から観察者2人の間の平均値（総数）

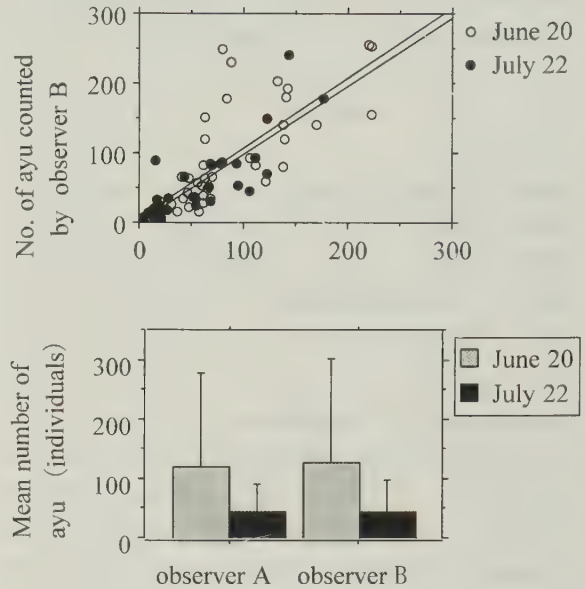


Fig. 2. Upper: The relation between the numbers of ayu counted by the observers A and B.

The both regression lines have slopes of about 1 ($r=0.919$ for Jun and $r=0.851$ for July 22). Lower: Mean number of ayu counted by observer A and B in small sections (near 50m length, 2m width) on June 20 ($n=45$) and July 22 ($n=39$).

はほぼ等しいと見なされた。鼠ヶ関川は比較的透明度が高く、通常観察者の位置から5m以上離れた両岸のアユ（体長6cm）を判別することができる。従って、2mの枠内における発見率はほぼ100%と見なした。現時点では、目視観察による個体数推定値は妥当な値であると考えている。しかし、増水に伴い河川の透明度が低下したときには、アユの発見率が明らかに低下し、単に、アユが確認できる距離で直線的に回帰したときには個体数を過小評価すると推定された。例えば、アユが確認できる距離が2mから1mになったときに単純に目視（距離）面積を50%と見なして生息尾数を算定すると明らかに過小評価する。ヒトの目をセンサーとして実測した個体数が正しいとしても、透明度が低下したときには発見率の補正を要するが、現時点では十分な検討はなされていない。目視個体数から資源量を推定する方法は、今後のさらなる理論的・技術的な測定精度の改善を要する。

調査河川におけるアユの動態について

鼠ヶ関川におけるアユの生活

2001年から2003年の調査で鼠ヶ関川のアユは4月下

旬頃～6月中旬に遡上・定着し、河口から上流5 kmまでの区間に分布する。毎年5000個体程度の人工種苗(最上川水系F1)が、第2堰堤と第3堰堤の中間地点に放流されている。成長したアユは7月1日以降友釣りで漁獲される。また、7月15日以後は第2堰堤より下流部では投網漁業も解禁されている。産卵は9月下旬から～11月の約2ヵ月間に、第1堰堤から河口までに局在する産卵場で行われる。仔魚の降下は9月下旬に始まり10月中旬に盛期をむかえて12月中旬に終わる(佐藤ら, 2002)¹。

鼠ヶ関川におけるアユの密度変化

2001年の調査では、遡上アユが4月28日に河口付近で発見された。同年5月と6月にはアユ個体密度は第2堰堤より下流側(河口から第1堰堤まで、および、第1堰堤から第2堰堤まで)が上流(第2堰堤から第3堰堤および第3堰堤から第4堰堤)より高く、7～9個体/m²に達した(Fig. 3, Abe *et al.* 2002)。他方、同時期の上流区間では生息密度は1個体/m²以下の低い値を示している。第2堰堤より下流のアユが上流部より多い傾向は他の年度にも認められ、第2堰堤がアユの遡上を阻害している事実が確認されている。個体密度の減少は上流よりも下流側が著しく、8月と9月の生息密度は、上流側と下流側の差が縮小した。雌雄とも8月中旬に生殖腺が急速に発達し始め、9月中旬には産卵可能なメスが現れ、10月と11月には産卵個体を確認した(Shimizu *et al.*, 2005)。産卵期のアユは下流に移動するため、10月には上流側の個体密度が激減した。

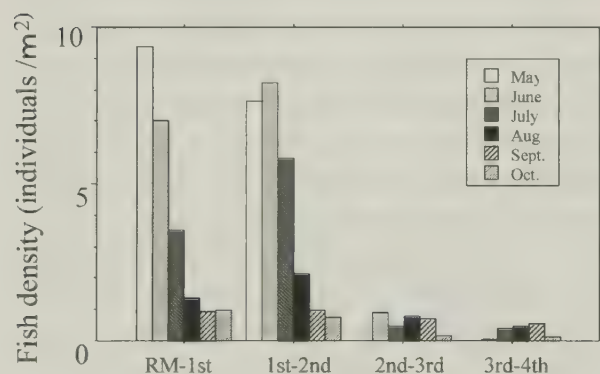


Fig. 3. Density of ayu in the four sections, RM-1st (river mouth - 1st dam), 1st - 2nd dam, 2nd - 3rd dam and 3rd - 4th dam, in May to October in 2001.

河川全体の個体数

生息密度に水域面積を乗じて推定した調査区間全域(約52,000m²)におけるアユの生息尾数は、2001年の5月から6月が最大の70,000尾以上に達した。その後、指数関数的に減少して、10月の産卵期には定着したアユの11% (約2万尾) が生き残ると推定された(Fig. 4)。2002年と2003年にも、アユの生息尾数は、5～6月が最大で、それぞれ10.6万および2.7万尾(うち放流魚1.2万尾)に達し、その後、指数関数的に減少して10月の産卵期には1.7万(16%) および0.5万尾(18%) が生き残ると推定されている。目視観察法(ライントランセクト法)を用いることにより遡上稚魚から産卵親魚に至るアユの生き残りの過程が把握できる。この個体数のモニタリング結果は、現在、日本海側の水域におけるアユ資源の変動過程やその機構を明らかにするための基礎知見として活用されている。

アユの現存量(資源量)

河川内のアユ個体数が把握されていれば、時期別・場所別(月・堰堤区間)の個体重の情報を得ることによって、アユの現存量を見積もることができる。

まず、投網等で採集した個体の体長・体重関係にもとづき目視個体の体長から個体重を算出した。鼠ヶ関川では堰堤区間や河川形態によって生息密度や体長組成が異なる。そこで、小区間毎に平均的な体長(体重に換算)と生息数から現存量を算定し、その値を4つの堰堤区間あるいは河川全体について集計した。このようにして求めたアユの現存量は2001～2003年に、それぞれ、最大1,000kg(8月)、600kg(5月)および400kg(7月)に達した。

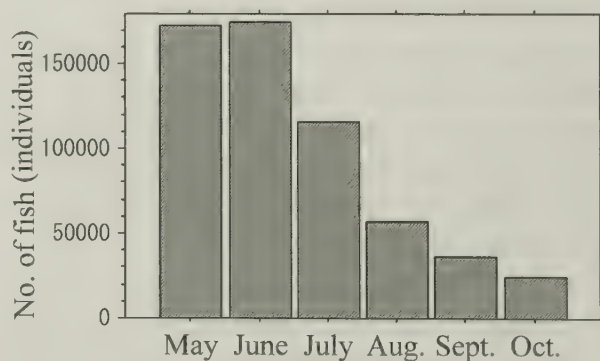


Fig. 4. Seasonal changes in the total number of ayu in the Nezugaseki River in 2001.

親魚の現存量と産卵ポテンシャル

産卵期の現存量と体重当たりバッチ産卵数がわかれば、アユの卵生産量（産卵ポテンシャル）が把握できる。2001年から2003年10月の雌親現存量は、実測したアユの平均体重に生息尾数を乗じて、それぞれ、205, 114および67kgだと計算された。鼠ヶ関川では毎年10月初旬に産卵がある。鼠ヶ関川のアユは10月から11月の間に同一個体が複数回産卵（多回産卵）することがわかってきたが（Simizu *et al.*, 2005），初回産卵については雌親1gあたり798個の卵をもつので（清水ら未発表, 2004），各年10月初めの卵生産量（産卵ポテンシャル）は、それぞれ、11.6千万個、9千万個および5千万個と推定された。多回産卵を考慮した場合の卵生産量については今後さらなる検討を要する。

降下仔魚

アユ降下仔魚の総数は、9月下旬から12月、河口付近ではほぼ5日毎に採集調査を実施して、流量密度法を用いて一日の降下仔魚数を算定し、期間内の変化を直線的とみなして引き延ばして推定した（佐藤ら未発表）。アユの降下仔魚総数は2001～2003年がそれぞれ、2800万、1768万および343万尾であった。産卵ポテンシャルから推定される卵数と仔魚数の関係から、鼠ヶ関川では卵から仔魚降海までの生き残りは2001～2003年にそれぞれ24, 20および7%と推定された。また、降海から遡上までのアユの生き残りは2000年級群（2000年秋生まれ）～2002年級群がそれぞれ、1, 0.4, 0.08%と推定された。これよりアユの減耗は河川生活期より海洋生活期が著しく、年変動も大きいことが示唆される（内田, 2003）。

放流魚の資源添加・再生産過程

放流魚の資源添加・再生産過程を把握するために2003年6月4日に山形県が生産したアユ人工種苗（鰭切除による標識、最上川水系F1, 12,000尾）を第2堰堤と第3堰堤の中間地点に放流して追跡調査した。時期別・堰堤区間別のアユの生息数は潜水調査で推定されている。各堰堤区間毎に電気ショッカーや投網を用いてアユを採集して、体長、体重、性、生殖腺重量を測定した。また、標識の有無を確認して放流魚と天然魚に判別して、放流魚の混獲率を求めた。堰堤区間毎に生息数に混獲率を乗じて、放流魚と天然魚の生息数を求め、さらに、河川全体の放流魚と天然魚の生息数に換算した。その結果、河川全体における放流魚の混獲率は、6月から10月初めまでの期間を通して、約40%と推定されている。2003年の放流魚は天然魚と遜色なく成長して生き残り、天然魚と同調して産卵に加入

することが明らかにされた。ただし、放流魚は天然魚より産卵期間中の死亡率が高く、早期に産卵を終えた。

ま と め

河川における放流アユの資源添加・再生産過程を定量評価する手法を開発するために、山形県鼠ヶ関川をモデル河川として漁場定着、産卵加入、孵化および海域への加入の各生活史段階における減耗過程を標識放流法、除去法、目視法、分布密度法等を用いて解析した。その結果、潜水目視法により河川生活期のアユ個体数の把握が可能であることが示され、2001～2003年の5～6月に遡上・定着したアユの11～18%が10月の産卵期まで生き残ると推定された。さらに、時期別・場所別に潜水目視で推定した個体数と放流魚の混獲率のデータを活用して、2003年に試験的に放流されたアユ（最上川水系F1）が、天然魚と遜色なく資源に添加して産卵に加入することが明らかにされた。

河川におけるアユの生活史をととした個体数変化を潜水調査によりモニタリングし、適当な採集調査で得られる放流魚と天然魚の混獲率、体長・体重・成熟に関する情報を加味することによって、アユの資源量（現存量）、卵生産量、環境収容力等、個体群動態の解析に資する情報が得られると考えられた。放流魚が競争や交雑を通して天然集団に与える影響を知るためには、アユの環境収容力と放流魚の繁殖特性の把握が必要である。アユの環境収容力と繁殖特性の解析は、個体数のモニタリングを継続するとともに、平成16年度から18年度に実施される本プロジェクト研究第2期の中心課題としたい。

文 献

- Abe S., Uchida K., Shimizu A., Nagumo T., and Tanaka J., 2004: Algal succession corresponding with the upstream migration of ayu *Plecoglossus altivelis* in the Nezugaseki River. *Jap. J. Phycol.* **52** (Supplement), 11-15.
- 水野信彦, 1991: 漁場平坦化の影響. 河川形態変化影響調査報告書-魚にやさしい川のすがた（水産庁編）. 81-162.
- Otake T., Yamada C., Uchida K. 2002: Contribution of stocked ayu (*Plecoglossus altivelis altivelis*) to reproduction in the Nagara River, Japan. *Fisheries Sci.*, **68**, 948-950.
- Shimizu A., Uchida, K., Abe, S., Udagawa, M., Sato, T., and Katsura, K., 2005: Evidence of multiple

spawning in wild amphidromous type ayu.

Fish. Sci., **71**, 1379-1381.

内田和男, 2003: アユの資源管理について, アユ資源

研究部会報告書平成12年度から平成14年度までの
とりまとめ, (全国湖沼河川養殖研究会アユ資源研
究部会編), p.17.

アユと河川生態系における他生物との関係

片野 修^{*1}・阿部信一郎^{*1}・中村智幸^{*2}

Relationships between ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* and other organisms in stream communities

Osamu KATANO^{*1}, Shinichiro ABE^{*1} and Tomoyuki NAKAMURA^{*2}

Abstract Although ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* did not change the abundance of inorganic nutrients such as phosphorus and nitrogen, ayu decreased the abundance of diatoms and increased the abundance of blue-green algae such as *Homoeothrix*. The intensive scraping of ayu also reduced the number of chironomid and tipulid larvae that mainly inhabit the upper surface of cobbles and boulders, and increased the percentage of ephemeropteran nymphs such as *Ephemeroptera*. Ayu had a negative effect on other omnivorous fishes such as Japanese dace *Tribolodon hakonensis* and pale chub *Zacco platypus*. In contrast, the presence of Japanese dace, pale chub and pike gudgeon *Pseudogobio esocinus esocinus* enhanced ayu growth by decreasing the number of algivorous invertebrates and increasing the algal biomass through trophic cascades. Interspecific relationships in stream ecosystems are thought to be very important for the management of biodiversity and ayu growth.

Key words: aquatic insect, ayu, benthic algae, stream community, trophic cascade

アユは内水面漁業にとって最も重要な水産資源であり、遊漁の対象としても人気が高い。近年ではダムや堰堤などの人工工作物によって河川が分断されたことや海産アユの資源減少のために、河川の上中流域ではアユが遡上せず、これを補うために大量のアユが種苗放流されている。

種苗放流にあたっては、放流先の生態系を著しく乱さないことが必要であり、アユについても大量放流が生態系にどのような影響を与えるのかを把握し、その影響を軽減する種苗放流を行うべきである。生態系の構成要素としては、他魚種、水生昆虫類、その他の無脊椎動物、底生藻類、水質などが重要である。生態系の他生物はアユの成長、生産にもさまざまな影響を与えると考えられる。他生物を適正に管理することによっ

てアユの生産を高めることも検討する必要がある。本稿では、プロジェクト研究の成果を中心に、アユが生態系の構成要素に与える影響ならびに他生物がアユに与える影響について明らかになったことを総説としてまとめ、提示する。

アユが他生物に与える影響

アユが底生藻類に与える影響

川で生活するアユにとって重要な餌は藍藻と珪藻である。藍藻は細菌と同じ原始的な形質をもった藻類であり、細胞内に多彩な色素を含み、青緑色に見えることが多い。藍藻は乾燥重量当たりの窒素含有率が高く、タンパク質を多く含んでいる。一方、珪藻はガラス質

2005年11月30日受理 (Received: November 30, 2005)

^{*1} 中央水産研究所内水面研究部 〒386-0031 長野県上田市小牧1088 (National Research Institute of Fisheries Science, Freshwater Fisheries Division, 1088 Komaki, Ueda, Nagano 386-0031, Japan)

^{*2} 中央水産研究所内水面研究部 〒321-1661 栃木県日光市中宮祠2482-3 (National Research Institute of Fisheries Science, Freshwater Fisheries Division, 2482-3 Chugushi, Nikko, Tochigi 321-1661, Japan)

の殻で細胞を包む特異な藻類であり、殻には微細な模様が施されている。珪藻は黄色の色素を多量に含んでいるため、茶褐色に見えることが多い。

アユを収容した人工河川とアユを除いた人工河川で、底に繁茂する付着藻類を調べると大きな違いがあることが報告されている。アユを除いた人工河川では、実験期間中常に珪藻が多く優占していた。一方、アユを収容した人工河川では珪藻の割合は著しく減少し、藍藻が増加した (Abe *et al.*, 2001)。アユによって増加する藍藻の代表例として *Homoeothrix janthina* という種が挙げられる。この種は細胞が1列に連なった糸状の形をしており、その先は毛のように細くなっている。その糸状体の一端で石に付着し、その色彩は黒味がかかっている。アユ釣りにおいて「黒い石を釣れ」とよく言われるのは、この藍藻が繁茂している石にはアユがついているという意味であると理解される。

自然条件下でも、アユによる藻類の変化が認められている。長野県の本川では、アユの食み跡のある磨かれた石では、糸状藍藻が多いことが報告されている (Abe *et al.*, 2000)。また山形県の鼠ヶ関川ではアユの遡上とともに川の藻類が珪藻から藍藻に変わることが観察されている (Abe *et al.*, 2004)。

このような藻類の違いは、アユの成長にも影響することが明らかになった。個体密度が高く藻類への摂餌圧が高い環境では、アユの成長速度は、珪藻群落よりも糸状藍藻群落を餌として飼育した場合に高かった (Abe, 2003)。珪藻はアユの摂餌によって急激に減少し、回復するまでに時間がかかる。それに対して糸状藍藻はアユに頻繁に摂食されても、その一部が刈りとられるだけで枯渇することではなく、常に一定の現存量を保ち、アユにとって餌を供給することになる。糸状藍藻の窒素含有率やカロリーも珪藻に比べて高い。したがってアユは自らの摂餌圧によって藻類群落を珪藻から藍藻に変え、その餌環境が自らの成長にとって都合のよいように改善すると考えられる。

アユが全くいない場所の石と比べてアユが摂食する石では、藻類の現存量は低下していることが多い。これはアユが藻類を餌として利用し体内にとりこむのであるから当然の帰結である。ただし、アユが食まない場所では、石上の砂泥は多くなることが本プロジェクトで明らかになっている (阿部ら、未発表データ)。藻類の組成、現存量の変化が、アユ以外の魚種や水生無脊椎動物に与える影響は今後の課題として残されている。

アユが水生無脊椎動物に与える影響

アユは川底の石を食み底生藻類を摂食するが、その

頻度は平均して1分間に7回以上に及ぶことがある (Katano and Iguchi, 1996; Katano *et al.*, 2004)。したがってアユの摂食行動は石上に生息する水生昆虫類などの大型無脊椎動物に大きな影響を与えると考えられる。琵琶湖産アユが放流される長野県依田川で、アユ放流区間と非放流区間で流速、水深の類似した場所を選び、丸石上の大型無脊椎動物群集を比較したところ、アユの摂餌の影響下にあった場所では、アユがいなかった場所に比べてカゲロウ目の割合が高い一方で、ユスリカ科やガガンボ科などの双翅目やその他の分類群に含まれる動物は少なかった (片野, 青沼, 1999)。双翅目の水生昆虫の多くが石の上面に巣をつくって生息していたためにアユの影響をうけやすかったと考えられる。カゲロウ目の中では、ヒラタカゲロウ科の幼虫の割合がアユの活動する場所で高かった。

アユの活動下では、石の上面に分布する無脊椎動物の割合が少ない傾向が認められ、アユの頻繁な摂食が上面における水生昆虫類の減少をもたらすと考えられる。一方、ヒラタカゲロウの仲間は石の上を滑りつつ底生藻類を摂食するのでアユの摂食によって滑らくなった石は活動しやすいと推察される。依田川では、アユの活動によって石の下部にすむ底生無脊椎動物はかえって多かった。この理由としては、アユの活動が石の下部の砂泥を取り除き水生無脊椎動物にとってすみよい環境にしたことが考えられる。石全体の水生無脊椎動物の個体数はアユの有無によって変わらなかった。

本プロジェクトでは、新潟県においてアユの遡上する小河川をフィールドに選び、アユの有無、アユの放流と取り除きなどによって、アユが水生無脊椎動物に与える影響を実験的に解析している。その成果については近日公表予定である。

アユが他魚種に与える影響

(1) 藻食魚への影響

アユは河川において主に石や岩に付着する底生藻類を摂食するが、藻類の現存量が極めて低い場所や藻類の生育条件の悪い大増水後には水面に落下する陸生昆虫類や水生昆虫も捕食する。したがってアユはその食物の大半が底生藻類である雑食性魚類と定義づけられる。このことからアユの摂食活動は、河川で底生藻類を利用する他魚種に大きな影響を与えると考えられる。しかし、琉球列島を除く日本の河川で底生藻類を専食する魚は、アユのほかにはアジメドジョウとボウズハゼを除くと見当たらない (宮地ら, 1976)。アジメドジョウとボウズハゼはその分布がそれぞれ中部・近畿地方の一部と茨城県以西の太平洋側であり (宮地ら, 1976)

地理的に限られている。また、同一河川においても、アジメドジョウは渓流域、ボウズハゼは下流域から汽水域に主に分布し、主に中流域に生息するアユと分布が全面的に重なるわけではない。

長野県木曽川支流小川での観察によると、人為的に放流されたアユとアジメドジョウは互いを攻撃することなく、藻類を食んでいた（片野、未発表データ）。またアユとボウズハゼについての観察によって、両者の行動圏の重なりあっている場所では互いに追ったり追われたりすることが報告されている（川那部, 1972）。藻類専食魚であるがために、アユとアジメドジョウ、アユとボウズハゼ間には食物をめぐる取り合い競争が生じているといっていよいであろう。ただし、一方の存在が他方の成長に負の影響を与えるか否かの実験は行われていない。またアユとアジメドジョウ、アユとボウズハゼの分布の重なりが大きくないことから、これらの種間関係が両者の分布・生活に大きなウエイトをもつか否かは疑問である。

（２）雑食性魚類への影響

河川に生息する魚類の多くは水生無脊椎動物や陸生昆虫類と底生藻類の両方を摂食する雑食性魚類である。アユの存在は、河川において底生藻類を摂食する他の雑食性魚類にも影響を及ぼすと考えられる。

雑食性魚類のうち河川でアユと同所的に生息し、底生藻類を摂食する割合の高い魚種としてオイカワがいる。オイカワはアユの存在下では瀬の一等地から川の岸際や水面近くに生息場所を変えることが示唆されていたが（川那部, 1960）、その実態については不明であった。

そこで私たちはアユがオイカワに与える影響について実験的に解析した（Katano and Aonuma, 2001）。直径1.8mの円形ビニールプールを18個水路に設置し、水中ポンプで水路からプールに河川水を送りこむ系をつくった。プールの底には塩化ビニール板をしき、水深を33cmに調整した。流速は水の流入口で秒速234cm、その他の場所では秒速10~20cmであった。各プールには5尾ずつ（2.0/m²）のオイカワを収容し、プールによって0~8尾（3.1/m²）の群馬県産人工アユを放流した。1実験期間は20日間とし、6月11日~7月1日（実験1）と8月27日~9月16日（実験2）の2回行った。

このプールにおいて、アユとオイカワはいずれも雑食性で、アユは藻類をオイカワは水生昆虫類を主食としていた。摂食方法について観察したところ、アユは底面を広く動きながら摂食行動を行っていたが、オイカワは水面近く動き回ったり、流れに定位して流下物を摂食することも多く認められた。プールにおいてアユの個体数が多いほど、オイカワが底面を動く摂餌方

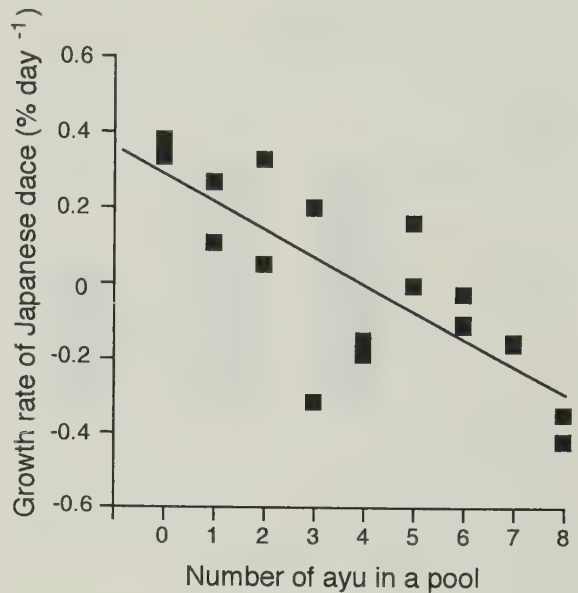


Fig. 1. Relationship between the number of ayu in a pool and the specific growth rate of Japanese dace (Ugui). After Katano *et al.* (2003)

法を採用する割合は減ったので、オイカワの摂食行動はアユに影響されていたことになる。また、実際にオイカワの成長率はアユの個体数が多いほど低く、この結果は実験1でも2でも変わらなかった。

同様の結果はウグイに対しても確認されている（Fig. 1）。アユが多いほど、藻類の現存量は低下し、ウグイの川床を動き回る割合は低下し、ウグイの成長率は低下した。アユの中にはなわばりをつくって他個体の侵入を許さない個体と群れをつくって活動する個体がいる。なわばりアユの中には、ウグイやオイカワをも攻撃する個体がいる。この攻撃率については個体差があり、アユの個体によって0~80%まで異なることが確かめられている（Katano *et al.*, 2004）。

（３）肉食性魚類への影響

アユの存在は河床の水生無脊椎動物全体を大きく減少させるわけではないので、それらを捕食するヤマメ、イwanaなどのサケ科魚類などの肉食性魚類に大きな負の影響を与えるとは考えにくい。しかし、アユの活動下では石の上面の水生昆虫類とくにガガンボ類やユスリカ類などの双翅目昆虫が減少するので、これらを主に捕食する底生性魚類に負の影響を与えることが考えられる。本プロジェクトでは未発表データながらアユの放流が、カマツカ、スミウキゴリなど底生魚類の成長に負の影響を与えることが解析されている（片野ら、未発表データ）。

アユが他魚種から受ける影響

アユの資源増殖を考えると、アユが他魚種からどのような影響を受けるのかを把握することはきわめて重要である。本プロジェクト研究ではアユがウグイから受ける影響を藻類や水生昆虫類とともに実験的に解析した。

先に述べた中央水産研究所上田庁舎内のビニールプール18個用いて実験を行った。実験1では、ウグイの存在による水生昆虫類、底生藻類への影響を明らかにするために、9プールにはウグイを6尾 ($2.36/\text{m}^2$) 放流し、残りの9プールにはウグイを放流しなかった。そして2000年9月15日から10月5日まで20日間の実験のち、各プールに設置した3枚の直径25cm厚さ2.5cmのカワラ（裏面に $3.2\text{cm} \times 25\text{cm}$ 、深さ0.8cmの溝が5本ある）から藻類と水生無脊椎動物を採集し

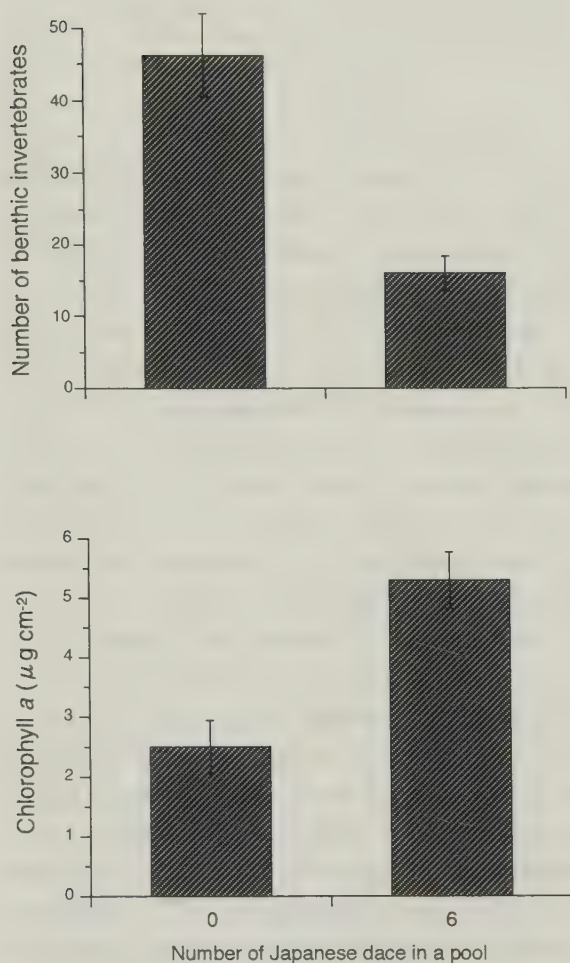


Fig. 2. The number of benthic macro invertebrates per 25×25 cm ceramic plate and the abundance of chlorophyll a in pools with 0 or 6 Japanese dace (Uguui). Error bars indicate ± 1 SE. After Katano *et al.* (2003)

た。実験2では各プールに群馬県産人工アユを5尾 ($1.97/\text{m}^2$) ずつ放流し、ウグイについては無作為に選んだ6プールでは0尾、6プールでは3尾 ($1.18/\text{m}^2$)、残りの6プールでは6尾 ($2.36/\text{m}^2$) 放流した。この実験を2000年と2001年の7月18日から8月29日までの各42日間行った。実験終了後に各魚の体長・体重を計測し成長を把握するとともに、カワラの底生無脊椎動物、底生藻類を採取した。

実験1においてウグイは底生藻類を50%、水面に落下する陸生昆虫類を15%、カゲロウやトビケラなどの水生昆虫を31%摂食していた (Katano *et al.*, 2003)。実験2においてウグイが藻類を摂食する割合は14%以下であり、ウグイは陸生昆虫類 (32%~39%) と水生昆虫類 (44~47%) を主食としていた。一方アユは、実験2において藻類を92~94%摂食していた。

実験1の結果では、ウグイの存在によって底生無脊椎動物の個体数は著しく減少した (Fig. 2)。これはウグイが直接水生無脊椎動物を捕食したことによると考えられる。ウグイの存在は底生藻類の現存量 (クロロフィル) を増加させたが、ウグイは藻類をも直接摂食していた。したがってウグイによる藻類の増加は直接の摂食によるものではなく、水生無脊椎動物の減少によると考えられる。ウグイは底生藻類を主食とするカゲロウ類やユスリカ類などの水生昆虫類を減少させ、そのことがトロフィックカスケード効果 (食物連鎖上で直接食う食われるの関係にない下位の生物に対して間接的に強い影響を与えること) を介して藻類の増加につながったと理解される (Katano *et al.*, 2003)。

実験2の結果はウグイの増加が底生無脊椎動物の減少とアユの成長の増大をもたらすことを明らかにしている (Fig. 3)。これはトロフィックカスケードによって増加した藻類をアユが摂食したことによる。

カスケード効果によるアユの成長への正の効果は、その後の本プロジェクトの研究により、ウグイだけでなく、カマツカ、オイカワによってもたらされることが明らかになった (Katano *et al.*, 2006)。河川や実験プールにおいて、カマツカはウグイよりも水生昆虫類を多く捕食し、オイカワはウグイよりも底生藻類を多く摂食する雑食性であった。実験プールにこれらの魚種を5尾ずつ放流すると、水生昆虫類とくに藻類を主に摂食するカゲロウ目幼虫と巻貝類は著しく減少し、トロフィックカスケードによって底生藻類の現存量は増大した。次に、これらの魚種のいずれか5尾とアユ5尾をとともに1つのプールで20日間飼育し、アユの成長量をしらべると、いずれにおいてもアユの成長量は高くなった。一方、アユだけを5尾もしくは10尾飼育するとその成長量は平均して負の値を示し、とく

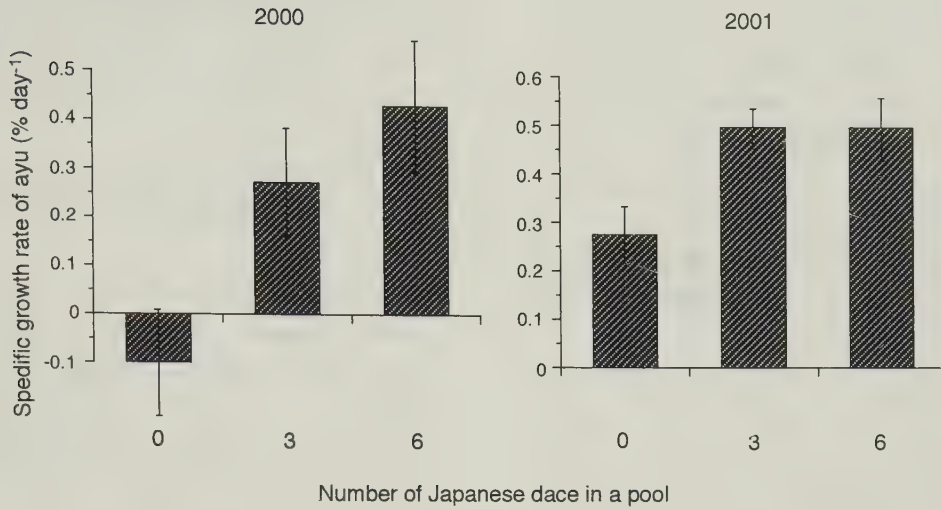


Fig. 3. The specific growth rate of ayu in pools with 0, 3 or 6 Japanese dace (Ugui). Error bars indicate ± 1 SE. After Katano *et al.* (2003)

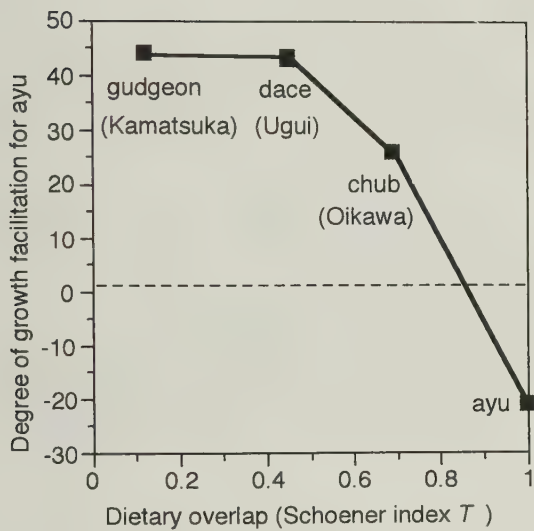


Fig. 4. Relationship between dietary overlap calculated using the Schoener index T and degree of growth facilitation for ayu that was calculated as (mean growth rate of ayu in pools with other species or 10 ayu) / (mean growth rate of ayu in pools with only 5 ayu). Broken 1 line indicates the growth rate in pools with 5 ayu. After Katano *et al.* (2006)

にアユ10尾の区では著しく低かった。アユと3種のコイ科魚類の食物重複度をそれぞれ単独でプールにおいて調べた資料を基に計算すると、オイカワ、ウグイ、カマツカの順に重複度は高かった (Fig. 4)。アユの成

長を高める影響は、オイカワよりもカマツカとウグイで高く、カマツカとウグイではほとんど差は認められなかった。その理由としては、カマツカは藻類をほとんど摂食しなかったが、カゲロウ、巻貝への捕食もウグイに比べて多くなく、主にユスリカ幼虫を捕食していたのでカスケード効果が強くなかったことが考えられる。アユと食性が重複するにもかかわらず、これら他魚種の存在がアユの成長を高めることが明らかになり、この成果は、河川における水産重要魚種以外の魚の保全の必要性、生態系における多種間相互作用の重要性を示す。

アユが水質に与える影響

アユが生息する河川や実験系での解析では、アユの存在・活動が河川の水中のリンや窒素に影響を及ぼすという結果は得られていない。

結 論

アユは河川の底生藻類や水生無脊椎動物に一定の影響を与えることが解析されたが、これらを枯渇させるほど減少させるのではなく、藍藻類やカゲロウ類など特定の生物を増加させることが明らかになった。アユは他魚種に対しても負の影響を与える場合のあることが解析された。影響を強くうける魚類は藻食魚、底生藻類を摂食する雑食性魚類、石の上面の双翅目幼虫を捕食する底生魚などである。したがってアユの放流に

あたってはこれらの生物に配慮することが必要である。また逆に、かつてアユが遡上していたが、資源減少、河川内工作物によって遡上できなくなった場合には、本来アユとともに生活していた生物がアユの不在によって影響されていることも想定される。また、ウグイ、カマツカなど水生昆虫類を多く捕食する他魚種の存在はアユの生産を高めることが明らかになった。この結果は河川における種々の生物間関係を解明することが重要水産魚種の生産を高めるうえで有意義であることを示す。

文 献

- Abe S., Katano O., Nagumo T., and Tanaka J., 2000: Grazing effects of ayu, *Plecoglossus altivelis*, on the species composition of benthic algal communities in the Kiso River. *Diatom* **16**, 37-43.
- Abe S., Uchida K., Nagumo T., Ioriya T., and Tanaka J., 2001: Effects of a grazing fish, *Plecoglossus altivelis* (Osmeridae), on the taxonomic composition of freshwater benthic algal assemblages. *Arch. Hydrobiol.*, **150**, 581-595.
- Abe S. 2003: Effects of ayu (*Plecoglossus altivelis*) on the structure and function of lotic benthic algal communities. 東京水産大学博士学位論文, 123 pp.
- Abe S., Uchida K., Shimizu A., Nagumo T., and Tanaka J., 2004: Algal succession corresponding with the upstream migration of ayu *Plecoglossus altivelis* in the Nezugaseki River. *Jap. J. Phycol.*, **52** (Supplement), 11-15.
- Katano O. and Iguchi K., 1996: Individual differences in territory and growth of ayu, *Plecoglossus altivelis* (Osmeridae). *Can. J. Zool.*, **74**, 2170-2177.
- 片野 修, 青沼佳方, 1999: 依田川におけるアユの丸石上の大型無脊椎動物群集への影響. 中央水研報, **14**, 39-48.
- Katano O. and Aonuma Y., 2001: Negative effect of ayu on the growth of omnivorous pale chub in experimental pools. *J. Fish Biol.*, **58**, 1371-1382.
- Katano O., Aonuma Y., Nakamura T., and Yamamoto S., 2003: Indirect contramensalism through trophic cascades between two omnivorous fishes. *Ecology*, **84**, 1311-1323.
- Katano O., Uchida K., and Aonuma Y., 2004: Experimental analysis of the territorial establishment of ayu, *Plecoglossus altivelis*. *Ecol. Res.*, **19**, 433-444.
- Katano O., Nakamura T., and Yamamoto S., 2006: Intraguild indirect effects through trophic cascades between stream-dwelling fishes. *J. Anim. Ecol.* **75**, 167-175.
- 川那部浩哉, 1960: 川の動物群集をどうとらえるかー食物関係にもとづく群集理解の試みー. 生理生態 **9**, 1-10.
- 川那部浩哉, 1972: アユの社会構造の進化史的意義について. 日生態誌, **22**, 141-149.
- 宮地伝三郎, 川那部浩哉, 水野信彦, 1976: 原色日本淡水魚類図鑑. 全改訂新版. 保育社, 大阪, 462 pp.

無節石灰藻を用いたアワビ類浮遊幼生用コレクターの有用性について

清本節夫
渡邊庄一
末永丈右
山中洋紀
藤井明彦
輿石裕一
堀井豊充

表面条件を変えた付着板がアワビ浮遊幼生の採集に及ぼす影響を調べるために、2001年10月から翌年2月に平戸及び壱岐でコレクター採集を行った。付着板は無節石灰藻を高被度と低被度に付着させたもの、褐藻の1種 *Myrionema* sp. を付着させたもの、および無処理の4種を用いた。その結果、高被度の無節石灰藻で最も多く採集され、無処理では採集されなかった。この結果から無節石灰藻を付着させたコレクターによりアワビ浮遊幼生を効率的に採集できることが明らかとなった。

No. 5, 91-96 (2006)

天然エゾアワビ幼生はどの程度の浮遊期間を経て着底するのか？

高見秀輝
深澤博達
河村知彦

エゾアワビ浮遊幼生は、受精後4日で着底・変態が可能となるが、着底基質に遭遇できなかった場合には変態せずに浮遊期間を延長し、最大で15日程度は正常に着底・変態する能力を保持したまま浮遊し続けるこ

とが明らかとなった。エゾアワビ幼生の歯舌列数から日齢査定法を確立し、天然海域で採集された浮遊幼生および変態後1日以内の初期稚貝について日齢を査定した結果、すべての個体 (n=112) が6日齢以内であった。

No. 5, 97-117 (2006)

ヒラメ人工種苗のDNAマーカー標識ー放流魚追跡のための効果的手法ー

関野正志

天然海域に放流されたヒラメ人工種苗を追跡するための、DNAマーカー標識の有効性を検証した。本研究で追跡した放流種苗は、旧日本栽培漁業協会宮古事業場 (JASFA, 現水産総合研究センター宮古栽培漁業センター) において、18尾の親魚候補 (天然魚) を使って作られ (JASFA種苗とする)、マイクロサテライト解析により、すべてのJASFA種苗の親が特定された。2001年の9月に、JASFA種苗は岩手県宮古湾に放流され、同時期同湾に、別の種苗生産施設からもヒラメ種苗が放流された。本研究では、マイクロサテライト多型およびミトコンドリアDNA調節領域の変異を遺伝標識として、JASFA種苗の追跡を行った。放流翌年の6ヵ月間に定置網に入網したヒラメ1歳魚1,576尾中、放流魚と推定された149尾を分析した。2つのタイプのDNAマーカーにより、そのうち35尾がJASFA種苗の再捕魚であると特定された。本研究により、ヒラメ放流効果の推定における、DNAマーカー標識の有効性が示された。

No. 5, 147-163 (2006)

水産総合研究センター研究報告 別冊 5 号
Bulletin of Fisheries Research Agency Supplement No.5

編集責任者：奥石裕一

平成18年 3 月31日 発 行

発 行 所 独立行政法人 水産総合研究センター
〒220-6115 神奈川県横浜市西区みなとみらい2-3-3
クイーンズタワー B15階
Fisheries Research Agency
Queen's Tower B 15F, 2-3-3, Minato mirai, Nishi-ku, Yokohama,
Kanagawa 220-6115, Japan
<http://www.fra.affrc.go.jp>

発 行 者 川口恭一

印 刷 所 株式会社 シーケン

ISSN 1346-9894

- ④ Delayed metamorphosis by larval Ezo abalone *Haliotis discus hannai*: How often does it occur in the field?
Hideki TAKAMI, Hirotatsu FUKAZAWA, and Tomohiko KAWAMURA 97
- ⑤ Effect of adult density on 0+ juvenile density of the abalone *Haliotis discus hannai*.
Hiroshi HOSHIKAWA, Kazuhiro TAKAHASHI, Fujinori TSUDA and Yuji MACHIGUCHI 119
- ⑥ Genetic variation in artificial seed of Japanese abalone, *Haliotis discus* based on microsatellite DNA.
Motoyuki HARA, and Masashi SEKINO 127

4) Japanese flounder sub-team

Summary of studies done by the "Hirame" group with the aim of improving stocking effectiveness of Japanese flounder.

- Hiroyuki SUDO 137
- ① Studies on genetic population structure and ecological-physiological characteristics of local populations of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*).
Kouji NAKAYAMA, Toshiyuki OHKAWA, Yuriko MARUKAWA, Yoshihiro TAINOSHO, and Masaru TANAKA 139
- ② Migration of released hatchery-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* along the Sea of Japan.
Tetsuo FUJII 143
- ③ Genetic profiling of hatchery-raised Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) based on DNA markers: an efficient means to track released flounder.
Masashi SEKINO 147
- ④ Predation mortality of hatchery-reared juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* released in Mano Bay, Sado Island.
Hiroyuki SUDO, Naoto KAJIHARA, and Tetsuo FUJII 165
- ⑤ Estimate of optimum stocking density of hatchery-raised Japanese flounder juveniles in Ohno Bay, Northeastern Japan.
Yoh YAMASHITA, Yutaka KURITA, Tetsuo YAMADA, Hideaki YAMADA, and Kazutaka TAKAHASHI 169

5) Ayu sub-team

Stocking effectiveness and impact of ayu on river biodiversity

- Kazuo UCHIDA 175
- ① Early life history of ayu in coastal waters.
Tsuguo OTAKE 179
- ② Progress in analyzing fish population structure in ayu with today's significance.
Kei'ichiro IGUCHI, and Hirohiko TAKESHIMA 187
- ③ Estimation of population number of ayu in the Nezugaseki River.
Kazuo UCHIDA, Akio SHIMIZU, Shin-ichiro ABE, Toshihiko SATO, Kazuhiko KATSURA, and Hiroyuki SAKANO 197
- ④ Relationships between ayu *Plecoglossus altivelis altivelis* and other organisms in stream communities.
Osamu KATANO, Shin-ichiro ABE, and Tomoyuki NAKAMURA 203

2) Japanese eel sub-team

Studies toward artificial production of glass eel.

- Tatsuya UNUMA 31
- ① Toward the improvements of broodfish management and egg quality of the Japanese eel, *Anguilla japonica*, for larviculture: egg collection from young broodfish and effects of broodfish diet on egg fatty acid contents.
Satoshi YAMADA, Katsuhiko HORI, and Manabu SEOKA 33
- ② Studies on factors affected in induced oocyte maturation, ovulation and egg quality in Japanese eel.
Hirohiko KAGAWA 39
- ③ Biochemical characteristics of yolk proteins in Japanese eel: involvement of selective yolk proteolysis in modulation of egg buoyancy.
Takahiro MATSUBARA, Tadashi ANDOH, Nobuyuki OHKUBO, and Sayumi SAWAGUCHI 45
- ④ Evaluation of egg quality in the Japanese eel *Anguilla japonica*, by individual rearing method.
Tatsuya UNUMA, and Kazuharu NOMURA 51
- ⑤ Developmental process of digestive system in Japanese eel larvae.
Tadahide KUROKAWA, and Tohru SUZUKI 57
- ⑥ Development of artificial diets and rearing systems for eel larvae: the first success of production of glass eel in captivity.
Hideki TANAKA, Kazuharu NOMURA, Takeshi YAMAMOTO, and Hiromi OKU 63

2. Development of seed releasing techniques on knowledge from ecological and molecular biological studies on resource addition

An approach to establish artificial reseeding techniques for the conservation of biodiversity and ecosystems in fisheries stock enhancement.

- Masaaki FUKUDA 71

3) Abalones sub-team

Summary of studies done by the "Awabi" group with the aim of elucidation of prerequisite for stock enhancement abalone

- Toyomitsu HORII 73
- ① Development of a discrimination method by using molecular and monoclonal antibodies techniques for *Haliotis discus discus*, *H. madaka* and *H. gigantea* during their early life stages.
Masami HAMAGUCHI, Miho SASAKI, Toyomitsu HORII, Setuo KIYOMOTO, Satoshi OHASHI, Akihiko FUJII, Naoyuki TAKIGUCHI, Kanako HASIMOTO, and Taisuke TAKENOUCHI 75
- ② A note on differences of species composition between swimming larvae and post-larvae of abalone, Haliotidae, in the coast of Sagami Bay.
Toyomitsu HORII, Hiroaki KUROGI, Yoshikazu KAJIGAYA, Naoyuki TAKIGUCHI, and Masami HAMAGUCHI 85
- ③ Utility of artificial settlement collector using crustose coralline algae for sampling abalone larvae in southwestern Japan.
Setuo KIYOMOTO, Shouichi WATANABE, Tomosuke SUENAGA, Hiroki YAMANAKA, Akihiko FUJII, Yuichi KOSHIISHI, and Toyomitsu HORII 91

BULLETIN OF FISHERIES RESEARCH AGENCY

Supplement No.5
March 2006

Bull.Fish.Res.Agen.

CONTENTS

Special issue: Development of seed production and releasing techniques for stock enhancement of marine resources considering the conservation of ecosystem

Preface

1. Development of seed production techniques based on knowledge from biochemical and molecular biological studies on development and maturation

Challenges to achieve closed cycle breeding of intractable species in seed production.

Hideki TANAKA 1

1) Kuruma prawn sub-team

Production of mature female shrimp in captivity: mechanisms of maturation and condition to induce maturation.

Keisuke YAMANO 3

- ① Hemolymph levels of vertebrate-type steroid hormones during ovarian development in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*.

Takuji OKUMURA 5

- ② Do the chemical components in wild prey have an influence to maturation of kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*?

Hiroaki SAITOH, Hideaki AONO, and Kentaro NIWA 9

- ③ Artificially induced maturation by eyestalk ablation in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*.

Reiko FUSEYA, Motohiko SANO, Hirofumi SHIMIZU, Motoya TAMAKI, Takeshi HAYASHIBARA, and Masaya KATO 15

- ④ Hormonal control of vitelogenin synthesis in the kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus*.

Katsumi AIDA 21

- ⑤ Oocyte development of kuruma prawn: process of biosynthesis of yolk materials.

Keisuke YAMANO, and Tatsuya UNUMA 25

Continued on inside back cover